Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM STRÖMUNGSVERHALTEN DER PERILYMPHE BEIM MEERSCHWEINCHEN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

FRITZ HARALD KAUPP
aus Haiterbach

1980

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. D. Plester

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM STRÖMUNGSVERHALTEN DER PERILYMPHE BEIM MEERSCHWEINCHEN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
FRITZ HARALD KAUPP
aus Haiterbach

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H. Heimann

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Plester

Meinem Chef, Herrn Professor Plester, bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Oberlassung des Themas dieser Arbeit, das große Interesse an deren Fortgang und für verständnisvolle Unterstützung bei der Fertigstellung.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. Giebel für unzählige wertvolle Anregungen und Hinweise, am allermeisten jedoch für seine allzeitige Präsenz.

Mein Dank gilt auch Frau Herrmann für tatkräftige Mithilfe bei der Herstellung der Foto-Reproduktionen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0057

INHALTSANGABE

1 Einleitung S. 1

1.1 Literaturübersicht S. 1

1.2 Eigenes Vorhaben S. 6

2 Materialien und Methoden S. 7

2.1 Operationsvorbereitung S. 7

2.2 Beschreibung der Operationsmethode S. 12

2.3 Vorbereitung zur Injektion S. 15

2.4 Beschreibung der Injektion S. 18

2.5 Einfrieren der Cochlea S. 20

2.6 Herstellung des Präparates S. 21

2.7 Verarbeitung am Kryotom S. 22

2.8 Mikroskopischer Nachweis von Fluoreszenz S. 24

2.9 Dokumentation S. 28

3 Ergebnisse S. 29

3.1 Rhodamininstillation in die Basalwindung der Scala tympani S. 30

3.2 Applikation von Fluorescein-markierten Globulinen in die Basalwindung der Scala tympani S. 34

3.3 Tote Kontrolltiere S. 35

3.4 Rhodaminapplikation in die 3. Windung der Scala tympani S. 37

3.5 Rhodaminapplikation auf das Runde Fenster S. 38
3.6 Totes Kontrolltier S. 40
3.7 Applikation von Rhodamin diffus in die Bulla S. 41
3.8 In-vitro-Versuche zur Ausbreitung von Rhodamin per diffusionem S. 41

4. Disskussion der Ergebnisse S. 42
4.1 Vergleich mit anderen Autoren S. 48

5. Zusammenfassung S. 55

6. Literaturverzeichnis S. 57

7. Bildanhang S. 70

1 Einleitung

Die Erforschung der Physiologie des Innenohrs ist seit Jahrzehnten Gegenstand weltweiter Bemühungen, die sich keinem absehbaren Ende nähern. Allein die mengenmäßig bedeutsamste Innenohrflüssigkeit, die Perilymphe, birgt noch viele ungelöste Fragen in sich. Über Orte und Modus ihrer Entstehung und Resorption ist nichts endgültiges bekannt. Bis in die jüngste Zeit wurde immer wieder der Liquor cerebrospinalis als Haupt- oder Nebenquelle propagiert, obwohl gewichtige Untersuchungen, insbesondere chemisch- analytischer Art dagegensprachen.

Potentieller Hauptverbindungsweg zwischen cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) und Perilymphe ist, zumindest bei kleinen Laboratoriumstieren wie dem Meerschweinchen, der Ductus perilymphaticus. Unter der Annahme, die Perilymphe leite sich tatsächlich ganz oder teilweise von der CSF ab, müßte zwangsläufig auch eine Strömung durch den Aquädukt vorliegen. Das würde aber bedeuten, daß in der Perilymphe gelöste Stoffe in ihrer Diffusionsbestrebung innerhalb des Aquädukts behindert werden. Dies zu untersuchen war das Ziel der vorliegenden Arbeit. (S. dazu auch Bildtafel I.)

1.1 Literaturübersicht

Der Aquaeductus cochleae wird in der anatomischen Nomenklatur auf-

geteilt in den knöchernen Kanal, bezeichnet als Canaliculus cochleae und in den bindegewebigen Inhalt, den Ductus perilymphaticus, bestehend aus Dura mater und Arachnoidea. Entdeckt wurde er 1684 von DU VERNEY. Erste morphologische Erkenntnisse gehen auf COTUGNO (1774) und RETZIUS (1884) zurück, spätere, detailliertere auf KARLEFORS (1929), MEURMAN (1931), OPPIKOFER (1944), LEMPERT (1952), v. SVANE-KNUDSEN (1958), ANSON et al. (1964), RITTER und LAWRENCE (1965), NEIGER (1968) sowie PALVA und DAMMERT (1971). Der Aquädukt wird dargestellt als leicht S-förmiger, von Dura ausgekleideter Kanal, in den die Arachnoidea einen Ausläufer abgibt, teilweise als Schlauch, teilweise als grobmaschigen Strang. WALTNER (1948) fand am tympanalen Aquäduktende eine zusammenhängende und damit obturierende Membran aus wenigen Zell-Lagen. Die Existenz dieser "Membrana limitans" ist bis heute in der von Waltner beschriebenen Form umstritten; nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von GALIĆ (1978) handelt es sich um ein Netzwerk aus Fibrozyten, das gegen den Aquädukt keine Verschlußfunktion ausübt.

Vermessungen des Aquädukts ergaben, daß er bei Primaten relativ lang und schmal, bei kleinen Laboratoriumstieren dagegen kurz und weit ist. WERNER (1960) gibt für das Meerschweinchen als Länge 1,2 bis 1,5 cm an, als Weite 110 bis 130 µm. MEURMAN (1929) verdanken wir den Hinweis auf eine Untersuchung von Gray, nach der Tiere, die ihren Kopf hoch tragen, allgemein einen sehr feinen Aquädukt besitzen.

Jeder Forscher, der die Verteilung suboccipital injizierter Stoffe zum Innenohr hin untersucht hat, hat dabei eine Durchgängigkeitsprüfung des Aquädukts vorgenommen. Je nach untersuchter Spezies ergaben sich durchaus verschiedene Ergebnisse. Eine leichte Passierbarkeit bei kleinen Laboratoriumstieren wie Kaninchen oder Meerschweinchen fand KARBOWSKI (1930) bei Anwendung von Tusche, MEURMAN (1931) für Eisensalze. Viele spätere Untersucher bestätigten dies (ALTMANN und WALTNER 1947, ARNVIG 1951, KLEY 1951, v. SVANE-KNUDSEN 1958, JAKO et al. 1959, SCHUKNECHT und SEIFI 1963, HUGHES und CHOU 1963, SANDO et al. 1971, ARNOLD und v. ILBERG 1971, ANGELBORG 1973, ARNOLD 1974, ORSULAKOVA 1976 und KOMMOSS und GIEBEL 1978). Einige hielten dies sogar als Indiz dafür, dies sei die physiologische Strömungsrichtung.

Keine Durchgängigkeit des Aquädukts beim Menschen und bei Primaten fanden LEMPERT (1962), RITTER und LAWRENCE (1965) und NEIGER (1968). Diese Befunde müssen jedoch eingeschränkt werden durch die klinischen Beobachtungen, daß nach operativer (Stapedektomie) oder traumatischer Innenohreröffnung schwallartige Oto-Liquorrhöen möglich sind, wobei in diesen Fällen allgemein ein zu weiter Aquädukt angenommen wird. (HEERMANN et al., 1976).

Neben dem Ductus perilymphaticus verdient ein weiterer Verbindungsweg zwischen Subarachnoidalraum und Perilymphe Beachtung. ALTMANN und WALTNER (1947) hielten einen schwachen Flüssigkeitsstrom entlang der Fasern des Nervus cochlearis für möglich. Auch KLEY

(1951) verwies unter anderem auf diesen Weg; er hatte nach operativem Verschluß des Aquädukts festgestellt, daß durch diese Manipulation die Perilymphe nicht versiegt. MOSEBECK (1965) hielt die perivasalen Lymphspalten in der Wand des Modiolus für mögliche Orte der Perilymphsekretion. Die Flüssigkeitsräume um die Nervenscheide des Hörnerven benannte SILVERSTEIN (1969) als mögliche Perilymphquelle. Mannigfache Verbindungswege zwischen perilymphatischen und perivasalen sowie perineuralen Räumen fand SANDO (1971) nach suboccipitaler Injektion von Kohlepartikeln. Ähnliche Beobachtungen machten ARNOLD und v. ILBERG (1971) und KIMURA et al. (1974).

WITTMAAK (1942) vertrat als Erster die Ansicht, daß die Perilymphe nur im Innenohr gebildet werde. Er nahm an, daß sie durch Diffusion aus dem Blutgefäßsystem unter Regulation durch das Endothel entstehe. Diese Ultrafiltrationstheorie vertraten auch GRAF und PORETTI (1950), die nach subcutaner und intraperitonealer Injektion eines Natrium-Tracers innerhalb von 30 Minuten eine so hohe Radioaktivität in der Scala vestibuli fanden, die eine Ableitung der Perilymphe aus dem Liquor ausschließe, zumal die Aktivitäten in der Scala vestibuli die der Scala tympani übertrafen. SCHINDLER (1965) fand in biochemischen Untersuchungen auffallende Übereinstimmungen von Perilymphe und Serum; Perilymphe und Liquor glichen sich dagegen nicht. Andere Autoren (KLEY 1951, JAKO et al. 1959, NOMURA 1961, SCHREINER 1966, NEIGER 1968, SILVERSTEIN 1969, SCHNIEDER 1974 und ORSULAKOVA 1976) maßen dem perilympha-

tischen Raum lediglich die zusätzliche Fähigkeit bei, Perilymphe zu produzieren - neben deren Ableitung aus der CSF. Hervorgehoben sei die Arbeit von Nomura, der nach intracardialer Trypanblau-Injektion besonders im Gebiet des Ligamentum spirale der Scala tympani eine extravasculäre Anfärbung sah und als Hinweis auf eine dort stattfindende Sekretion deutete.

Die Herkunft der Perilymphe aus der Endolymphe, von KOBRAK (1949) angenommen, wurde von GRAF und PORETTI (1950) abgelehnt. MEYER (1951) und WALTNER (1954) fanden lediglich Hinweise für eine kompensatorische Endolymphmehrproduktion als Reaktion auf eine Eröffnung des Perilymphraumes und dadurch verursachten Lymphverlust. RAUCH (1964) hielt die Entstehung der Peri- aus der Endolymphe für eine bestenfalls partielle, unbedeutende Möglichkeit.

Bis heute herrscht keineswegs Klarheit über die wirkliche Herkunft der Perilymphe. Aufgrund der mikro-quantitativen, chemisch-analytischen Untersuchungen von GIEBEL (1973) kann sie weder als Derivat des Liquors noch als reines Ultrafiltrat des Serums angesehen werden. Die Ansicht von KOBRAK (1949), der die Hypothese eines longitudinalen Hauptstromsystems und mehrerer (nutritiver) Distriktstromsysteme aufstellte, kann durchaus nicht als überholt angesehen werden.

1.2 Eigenes Vorhaben

Dieser Arbeit liegt die Überlegung zugrunde, daß zwar schon viele Untersuchungen über das Strömungsverhalten der Perilymphe durchgeführt worden sind, daß dabei aber nie der Empfindlichkeit des genzen Flüssigkeitssystems gebührend Rechnung getragen worden ist.

Nunmehr sollte die Perilymphe mit einem gut wiederauffindbaren Farbstoff markiert und dessen zeitabhängige Verteilung verfolgt werden. Dabei wurde mengenmäßig in einer Dimension gearbeitet, die derzeit nur schwer unterschritten werden kann. Durch die Instillation auch dieser geringen Menge Farbstoffs mußte jedoch notgedrungen das Flüssigkeitssystem eröffnet werden. Eine Vergleichsstudie, bei der der Farbstoff durch Diffusion in die Perilymphe gelangte, wobei das System geschlossen blieb, konnte über die physiologischen Verhältnisse den bestmöglichen Aufschluß geben.

2 Materialien und Methoden

2.1 Operationsvorbereitung

Die experimentellen Untersuchungen wurden, einschließlich aller Vorversuche, an etwa 80, dem äußeren Aspekt nach gesunden Meerschweinchen mit einem Gewicht von 200 bis 400 g durchgeführt. Um nicht erst unter der Operation feststellen zu müssen, daß ein Tier mittelohrkrank und damit unbrauchbar ist, wurde noch vor der Narkotisierung eine Trommelfellinspektion durchgeführt. Dies ist mit einem üblichen, kleinkalibrigen Ohrtrichter leicht möglich, wenn man dem Tier zuvor die Augen - mit Zellstoff oder dergleichen - abdeckt. Erwartungsgemäß fanden sich intra operationem bei keinem Tier mit reizlosem Trommelfell Zeichen einer Otitis media. Diese Methode ist zur Erkennung einer Mittelohrerkrankung wesentlich zuverlässiger als die Prüfung des Preyerschen Ohrmuschelreflexes.

Sowohl zur Otoskopie wie auch zu den Operationen diente ein Zeiss Operationsmikroskop (OPMI II, Zeiss, Oberkochen) mit Tischstativ, bestückt mit 12,5-fach vergrößernden Okularen, einem Objektiv mit 150 mm Brennweite sowie einer 50-Watt-Birne.

Für die weitere Beschreibung sind vier Versuchsreihen zu unterscheiden, je nach gewähltem Zugangsweg bei der Markierung der Perilymphe:

I. Farbstoffapplikation in die Basalwindung der Scala tympani nahe dem Runden Fenster (durch die eröffnete Mastoidschuppe). Als Farbstoff: a) Rhodamin B
b) Fluorescein-markierte Globuline.

II. Farbstoffapplikation in die 3. Windung der Scala tympani (durch die eröffnete Mastoidschuppe); als Farbstoff Rhodamin B.

III. Rhodamin-Applikation auf das Runde Fenster (durch das eröffnete Mastoid).

IV. Applikation von Rhodamin B diffus in die Bulla (durch das Trommelfell).

Die Versuchsreihe IV stellt eine Kontrollgruppe von Tieren dar, die vor der Farbstoffapplikation nicht narkotisiert worden waren. Etwa 1 ml Rhodamin B wurde vermittels einer Insulinspritze, die mit einer Kanüle Nr. 17 armiert war, durch den Ohrtrichter transmyringeal in die Bulla eingespritzt. Die Trommelfellperforation erfolgte im hinteren oberen Quadranten. Ein anschließendes mehrfaches Drehen und Wenden des Kopfes sollte gewährleisten, daß sich der Farbstoff in der ganzen Bulla verteilt. Nach 10 Minuten erhielten die Tiere eine Äthernarkose, 2 bis 6 Minuten später wurde - nach sicherem Eintritt der Narkose - der ganze Kopf in

flüssiger Luft gefroren. Die Entnahme der Schnecken folgte der unten beschriebenen Methode.

Die Vorbereitungen bis zur Perilymphmarkierung bei den Versuchsreihen I bis III waren in wesentlichen Punkten übereinstimmend: Diese Tiere erhielten eine Narkose, bei der - entgegen häufig geübter Praktik - das Narkotikum nicht in fixer Relation zum Körpergewicht bemessen wurde; dieses Vorgehen konnte bei den ersten Versuchen nicht befriedigen. Deshalb erhielten die Tiere zunächst - grob nach Körpergewicht abgestuft - 1,0 bis 1,2 ml Urethan in 40 %iger Lösung intraperitoneal; als zweckmäßig erwies sich, besonders unruhigen Tieren a priori 0,1 ml mehr zu geben.

Nach Ablauf von einer Stunde konnte mit einer genügenden Narkosetiefe gerechnet werden, das heißt, daß bei kräftigem Kneifen am freien Rand der Ohrmuschel keine Schmerzreaktion ausgelöst werden konnte. War dies dennoch der Fall, wurden 0,1 bis 0,2 ml Urethan nachgespritzt; die Schmerzprüfung wurde nach 15 bis 20 Minuten wiederholt.

Eine Minderzahl der Tiere wurde mit Ketanest^{R} (Parke, Davis & Company, München), zusammen mit lokaler Anwendung von 1 %igem Novocain^{R} (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/M.) narkotisiert und analgesiert. Das Ergebnis war nicht zufriedenstellend.

Als Substanzen zur Markierung der Perilymphe dienten entweder eine frisch bereitete 2%ige Rhodaminlösung (Rhodamin B, Merck, Darmstadt) oder Fluorescein-markiertes Globulin in verschiedenen Konzentrationen (pentex^{R} Anti-Human-Serum, Globulin vom Kaninchen, konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat, Miles Laboratories Inc., Kankakee). Rhodamin hat die Eigenschaft, bei normaler Beleuchtung (Tages- oder Glühlampenlicht) durch seine hohe Farbintensität als roter Farbstoff aufzufallen. In wesentlich geringeren Konzentrationen aber ist es - unter ultravioletter Beleuchtung - an Geweben nachweisbar, nachdem es sich mit ubiquitär vorhandenen Lipoproteinen zu einem Komplex verbunden hat. Es emittiert, ultraviolett angeregt, Licht im sichtbaren Bereich. Die Fluorescein-markierten Globuline dagegen eignen sich wegen ihrer geringeren Farbsättigung ausschließlich zum Nachweis unter ultravioletter Bestrahlung. Sie haben aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes in weitaus geringerem Maße als Rhodamin das Bestreben, in andere Räume zu diffundieren. Diesem unbestreitbaren Vorteil stehen jedoch erhebliche Nachteile gegenüber; darauf wird im Kapitel "Diskussion" ausführlich eingegangen.

Als "Kanüle" zur Instillation der Markierungsstoffe diente für die Versuchsreihe I und II eine für jedes Experiment eigens präparierte Glaskapillare (Abb. 1). Ein Schmelzpunktbestimmungsröhrchen mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm und einer Länge von 80 mm wurde in einer sehr schwachen Bunsenflamme an einem Ende

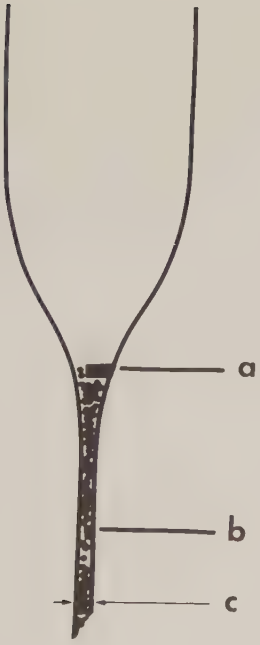


Abb. 1 Graphische Darstellung der Glaskapillare für die Farbstoffinstillation.

(a = 0,1-µl-Marke; b = Markierung der maximalen Einführtiefe, 0,5 mm oberhalb der Kanülenspitze; c = maximaler Außendurchmesser der Injektionsspitze 0,1 mm.)

konisch ausgezogen, dann unter dem Operationsmikroskop so abgebrochen, daß die später zur Injektion dienende Spitze einen äusseren Durchmesser von weniger als 0,1 mm und näherungsweise die

Form einer Metallkanülenspitze aufwies. An dieser Spitze wurde die Markierungslösung eingebracht: Aus einer Mikrospritze (Terumo UMS-01, Shandon, Frankfurt/M.) wurden 0,1 µl der entsprechenden Lösung durch Kolbenvorschub auf deren Kanülenspitze vorgelegt und das ausgedünnte Ende der Glaskapillare sofort mit diesem volumendefinierten Tropfen in Kontakt gebracht, der ohne weiteres Zutun durch Kapillarkräfte vollständig abgesaugt wurde. An der Stelle, bis zu der der Farbstoff in der Kapillare aufgestiegen war, wurde außen mit Filzstift eine Markierung angebracht. Das anschließende Schockgefrieren der Kapillare in flüssiger Luft und die nachfolgende Evaporation auf der zuvor ebenfalls mit flüssiger Luft gekühlten Metallplatte einer Vakuumpumpe (Typ GT 2, Leybold-Heraeus, Köln) führte zur Gefriertrocknung der eingefüllten Farbstofflösung. Abschließend wurde 0,5 mm oberhalb der Spitze mit Farblack eine Marke angebracht.

Die so präparierte Kanüle enthielt 2 ng kristallines Rhodamin.

2.2 Beschreibung der Operationsmethode

Operiert wurde jeweils das rechte Ohr, ohne auf sterile Kautelen zu achten.

Für die Versuche der Reihen I bis III wurde nach ausgiebiger

Enthaarung des Operationsfeldes mit der Schere in ca. 2 mm Abstand vom Ohrmuschelansatz mit dem Skalpell supraauriculär ein Schnitt geführt und bis über das tastbare hintere Ende der rechten Mandibula verlängert. Unter Abspreizen der Wundränder wurden nach und nach alle Hautschichten und die Muskelfaszien mit dem Skalpell durchtrennt. Die Mastoidschuppe ist als Prominenz tastbar. Die Insertionen der an ihr ansetzenden, von rostral und kaudal kommenden Muskeln wurden - teils scharf, teils stumpf - abgelöst und die Schuppe freigelegt. Um später die Schnecke aus der geeigneten Richtung angehen zu können, war das Hinterende der Mandibula um ca. 1/2 cm zu resezieren, nachdem die am Resektionsstück ansetzenden Muskeln stumpf abgelöst worden waren. Die Resektion erfolgte mit einem Scherenschlag. Dabei auftretende, in der Regel nur geringfügige Blutungen sistierten meist in Kürze unter leichtem Druck mit einer Zellstoffkompresse.

Sofern Farbstoff nur auf das Runde Fenster aufgetragen werden sollte, also bei der Versuchsreihe III, erübrigte sich die Mandibularesektion, weil sich bereits durch ein kleines Loch in der Mastoidschuppe ein an einer ausgezogenen Glaskapillare hängender Tropfen Farbstoff auf das Runde Fenster applizieren läßt.

In jedem Fall wurde die Mastoidschuppe an ihrer prominentesten Stelle mit der Spitze einer kleinen Schere unter drehender Bewegung vorsichtig perforiert und die Öffnung unter operations-

mikroskopischer Sicht mit einer spitzen Pinzette auf ca. 2 mm Durchmesser erweitert - unter Schonung der Cochlea, des Facialiskanals, des Bogengangsystems und der Gehörknöchelchenkette.

Soweit die vorbereitende Operation für die Versuchsreihe III, bei der nun ein an einer Glaskapillare hängender Tropfen Rhodaminlösung durch das Loch in der Mastoidschuppe eingeführt und in Kontakt mit der Membran des Runden Fensters gebracht wurde.

Bei den Versuchsreihen I und II mußte anhand des (OP-mikroskopisch verfolgten) tympanalen Verlaufs des Facialiskanals der Gesichtsnerv mit äußerster Sorgfalt freipräpariert und - ohne ihn zu zerren - in 3 mm Abstand von seiner Knochenaustrittsstelle scharf abgetrennt werden. Damit wurde ein Auslaufen von Liquor cerebrospinalis entlang der Facialisscheide sicher verhindert; ansonsten wären die intracraniellen und intracochleären Druckverhältnisse erheblich gestört und die Ergebnisse von vornherein in Frage gestellt gewesen. (Die Facialispräparation entfiel bei der Versuchsreihe III, da hier eine Insultierung des Nervs nicht zu befürchten war.)

Nun erfolgte die weitere Eröffnung der Bulla bis zum äußeren Gehörgang, das Abknipsen des Manubrium mallei mit einer spitzen Pinzette und die Entfernung des Trommelfells. Darüberhinaus wurde die Mastoidschuppe - immer unter dem Mikroskop - mit Zängelchen

und Pinzette soweit ausgebrochen, daß die Basalwindung der Schnekke (in der Nähe des Runden Fensters) bei horizontaler Lage vertikal angegangen werden konnte. Eine wesentlich weitergehende Eröffnung verlangte die Versuchsreihe II mit ihrere Zugangsstelle zur Perilymphe über der 3. Windung der Scala tympani; hierzu mußte die Mandibula "nach Maß" nachreseziert werden und der darunterliegende Bullabereich - nach stumpfem Abschieben der Muskelansätze - weiter freigelegt werden, so daß eben ausreichend Raum für die Manipulationen zur Farbstoffinstillation an unten näher beschriebener Stelle geschaffen war.

2.3 Vorbereitung zur Injektion

Das Tier wurde nun in einen Kopfhalter nach Paparella (modifizierte Version) eingespannt. Der mehrfach verstellbare Halter war mit einem Tischstativ verbunden. Der Kopf des Tieres wurde dann in diejenige Position gebracht, bei der der spätere Injektionsort waagerecht zu liegen kam. Dieser Ort lag bei der Versuchsreihe I auf der Basalwindung der Cochlea über der Scala tympani, 3 mm vom Runden Fenster und 2 mm vom basalen Rand des Ligamentum spirale entfernt, das als etwas hellerer Streifen durch den Knochen schimmert. Analog dazu lag der Ort bei der Versuchsreihe II (s. Abb. 2) auf der Verbindungslinie zwischen der eben beschriebenen (hier gedachten) Zugangsstelle über der

Basalwindung mit dem Apex cochleae, dicht neben der Stria vascularis, die am leichtesten dann ausgemacht werden kann, wenn das Tier dunkle Farbkomponenten im Fell aufweist. Diese Tiere haben in den oberen Windungen durch Pigmenteinlagerungen eine etwas dunklere Stria vascularis, die deutlich durch den Knochen schimmert.

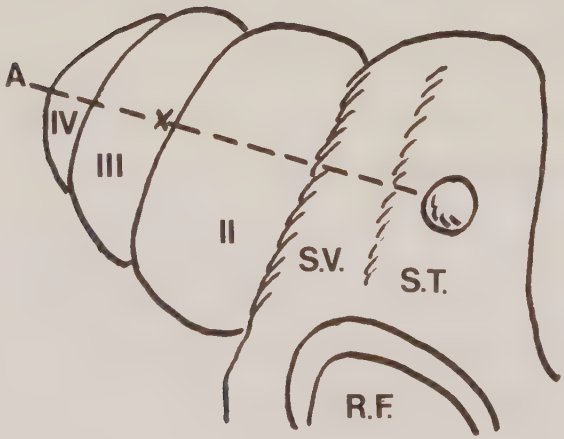


Abb. 2 Injektionsort zur Perilymphmarkierung in der Scala tympani der 3. Windung. Erklärung s. Text.

(R.F. = Rundes Fenster; S.T. = Scala tympani der Basalwindung; II - IV = 2. - 4. Schneckenwindung; A = Apex cochleae.)

Das weitere Vorgehen folgte der Methode nach GIEBEL (1974). Als nächster Schritt wurde der Knochen an der späteren Markierungsstelle ausgedünnt. Dafür wurde an der Basalwindung ein Bohrgerät, wie es in der Otochirurgie gebräuchlich ist, verwandt. Das Bohrfutteral war eingespannt in einen horizontal und vertikal verstellbaren Mikromanipulator (Serie MP, Brinkmann, Mannheim), als Bohreinsatz diente ein Metallstift, dessen Bohrspitze dreikantig und streng zentrisch zugeschliffen worden war, bis sie einen Maximaldurchmesser von 0,2 mm aufwies. Damit konnte an der späteren Injektionsstelle eine Mulde in den Knochen gebohrt werden, die idealerweise bis eben an das Endost reichte, so daß der Perilymphraum noch verschlossen war. Häufig wurde der Bohrvorgang zur Sicherheit etwas früher abgebrochen und das verbliebene Knochenplättchen über dem Endost im Zuge der ohnehin noch erforderlichen Punktion perforiert (Bildtafel II, Abb. 1 und 2).

Die Mulde wurde über den Bohrrand hinaus mit einem ca. 2 x 2 mm großen Stück Tesafilm (Klebeseite auf dem Knochen) abgedeckt. Um eine feste Verbindung des Films mit dem Knochen zu erzielen, wurde die Spitze einer Uhrmacherpinzette, zwischen deren Branchen ein Tropfen des Gewebeklebers Histoacryl^{R} blau (Braun, Melsungen) gegeben worden war, an die Unterseite eines der Tesafilmränder gehalten, worauf der Klebstoff gleichmäßig und selbständig untergesogen wurde (Bildtafel III, Abb. 1). Dabei wäre unerwünscht gewesen, wenn sich die Mulde mit einem Histoacryl-"See" angefüllt

hätte. Dies ließ sich vermeiden durch leichten Druck auf den Tesafilm über der Mulde mit einer zweiten Pinzette; der Tesafilm paßte sich dann in die Mulde ein.

Insgesamt war das Vorgehen bei den Versuchsreihen I und III im wesentlichen identisch, jedoch erübrigte sich das Vorbohren am Knochen über der 3. Windung, weil er in apikalen Bereichen ohnehin äußerst fragil ist.

2.4 Beschreibung der Injektion

Die zur Injektion bzw. Markierung dienende Glaskapillare wurde, von einer eng anliegenden Manschette aus einem Stück Plastikschlauch vor Bruch geschützt, mit der Spitze genau senkrecht nach unten in einen Mikromanipulator (Typ RP 5, Brinkmann, Mannheim) eingespannt und konnte mit dessen Hilfe dreidimensional bewegt werden. Das obere Ende der Kapillare wurde mit dem ölgefüllten Schlauchsystem einer Micro-Handbürette (Typ E 457, Metrohm, Herisau, Schweiz) verbunden und das Öl bis knapp an die Füllmarke der Glaskapillare vorgetrieben, jener Stelle also, bis zu der später die Perilymphe aufsteigen mußte.

Die Kapillarspitze wurde jetzt in Injektionsposition gebracht; allerdings berührte sie den Tesafilm noch nicht, denn die Perfo-

ration von Tesafilm, eventuell verbliebenem Knochenplättchen und Endost wurde nicht mit der fragilen Glaskapillare, sondern mit einer präparierten "Nadel" durchgeführt. Um diese "Nadel" herzustellen wurde ein wenige Millimeter breites Stück einer frischen Rasierklinge an der Schneide mit einem Kugelkopfdiamantbohrer bis auf eine Breite von 0,1 mm verschmälert, wobei sich durch geeignete Drehrichtung des Bohrers eine Verletzung der Schneide des Klingenstücks vermeiden ließ. 0,5 mm oberhalb der Nadelspitze wurde mit Farblack eine Markierung angebracht.

Diese, mit einer Kocher-Klemme gehaltene Nadel wurde unter mikroskopischer Sicht aus der Hand bis an ihre 0,5 mm-Marke eingestochen; ihre Spitze erreichte dabei den Perilymphraum. Die Kapillare war vorher deswegen in Injektionsposition gebracht worden, um eine Orientierungshilfe zu geben, weil sonst durch die Umlenkung im Strahlengang das Mikroskops die Vertikale als Einstichrichtung kaum hätte ermittelt werden können.

Durch den Einstich entsteht ein Kanal, der sich sofort schließt, wenn die Nadel wieder herausgezogen wird; ein Perilymphverlust unterbleibt normalerweise.

Durch den vorgegebenen Kanal wurde nun die Glaskapillare eingeführt und zwar ebenfalls bis an ihre 0,5 mm-Marke. Beim ersten Kontakt mit der Perilymphe steigt diese in die Kapillare auf.

Einen dosierten Aufstieg bis zur Füllmarke ermöglichte die Verbindung mit der Handbürette. Der gefriergetrocknete Farbstoff löste sich augenblicklich in der einfließenden Perilymphe (Bildtafel III, Abb. 2).

Die nunmehr markierte Perilymphe wurde durch Ölvorschub mit der Bürette langsam in die Scala tympani zurückgegeben.

Im Idealfall, der allerdings nicht immer gegeben war, fand somit eine Bewegung von 0,1 µl Perilymphe statt. (Die gesamte Perilymphe veranschlagt FERNANDEZ, 1952, nach Lumen-Querschnittsmessungen mit 16 bis 18 µl.)

2.5 Einfrieren der Cochlea

Die Ausbreitung der markierten Perilymphe wurde nach der gewünschten Zeit durch Frieren mit flüssiger Luft unterbrochen, wobei in die offene Bulla 2 x 20 ml flüssige Luft eingespritzt wurde. Es bot sich an, dazu eine Einmalspritze entsprechenden Fassungsvermögens ohne Kolben mit aufgesetzter Kanüle Nr. 1 mit der Flüssigkeit zu füllen, die durch die zwangsläufige Erwärmung unter beträchtlichem Druck durch die Kanüle entweicht, wenn die Spritze hinten mit einem passenden Plastikstöpsel abgedichtet wird. (Die Spritze war in einen Handgriff eingeschraubt; als Handschutz dienten dicke Zellstofflagen.)

Nach Einfrieren der Bulla wurde sofort der gesamte Kopf des Tieres in flüssige Luft getaucht und ausgiebig gefroren.

2.6 Herstellung des Präparates

Mit einer Bandsäge wurde aus dem Kopf der Präparatblock herausgesägt; er bestand aus beiden Schnecken und den dazwischenliegenden Strukturen. Anatomisch-topographisch hilfreich war für die Schnittführung, daß die Schneckenachse (baso-apikal) nahezu parallel zum Nasenrücken des Tieres in der Bulla liegt. Der erste Schnitt wurde senkrecht zu dieser Achse knapp hinter beiden Augen geführt; der zweite parallel zu diesem in kaum 1 cm Abstand kaudal der Operationsöffnung in der Mastoidschuppe; der dritte Schnitt senkrecht zu den vorherigen (und parallel zur Transversalen) von der Kopfunterseite kommend in einigem Abstand von der Operationsöffnung, anhand derer die Lokalisation der Schnecke eingeschätzt werden konnte. Alle folgenden, möglichst dünnen Schnitte lagen parallel zu diesem und verfolgten den Zweck, sich an die Bullae vorzuarbeiten. Sobald wenigstens eine Pauke erstmals angeschnitten war, erkennbar an einer winzigen Öffnung im Gewebeblock, wurde mit einem abschließenden Schnitt, mindestens 1/2 cm dorsal der Schnecke, der Block handhabungsgerecht verkleinert.

Nach jedem Schnitt wurde der Block in flüssiger Luft nachgefroren, um ein zwischenzeitliches Auftauen zu verhindern.

2.7 Verarbeitung am Kryotom

Konnte das soweit vorbereitete Präparat nicht umgehend weiterverarbeitet werden, wurde es im Gefrierschrank gelagert. Ansonsten erfolgte nunmehr am Kryotom (WK 1150, Firma WK, Brandau) die Auswertung, deren Prinzip darin bestand, den Block, bestehend aus beiden Mittel- und Innenohren, den perilymphatischen Aquädukten und dazwischenliegenden rhombenzephalen Abschnitten, in 20 µm dicke Scheibchen aufzuschneiden, um dadurch dreidimensional beurteilen zu können, wie weit sich der Markierungsstoff während der Versuchsdauer, also bis zum Ausbreitungsstop durch Frieren, nachweisbar entfernt hatte.

Die Untersuchungen am Kryotom wurden wieder unter OP-mikroskopischer Sicht durchgeführt. Das Mikroskop war an einem Bodenstativ (Zeiss, Oberkochen) beweglich aufgehängt, mit einem Objektiv von 200 mm Brennweite bestückt und zur photographischen Dokumentation eingerichtet.

Wenngleich jede Schnittebene auf Spuren des Markierungsstoffes untersucht wurde, galt das besondere Augenmerk doch jenen Ebenen,

die charakteristische Strukturen enthielten, wie beispielsweise den Abgang des Aquädukts aus der Scala tympani oder dessen trichterförmige Mündung in den Subarachnoidalraum.

Zur Steigerung der Aussagekraft durch bessere Vergleichbarkeit aller Versuche war anzustreben, die Präparate ebenengleich zu schneiden; dementsprechend wurde bereits der erste Schnitt parallel zu beiden Schneckenachsen geführt.

Für die Arbeit am Kryotom hat sich folgendes Vorgehen bewährt: Bei einer Raumtemperatur von -20° C wurde eine kalte, nasse Zellstoffkompresse auf den oberflächenrauhen, vertikalen Kryotisch gelegt und in diese das Präparat so eingepaßt, daß die Schneckenspitzen nach unten zeigten. Eine Schnellfriereinrichtung ermöglichte, den Zellstoff-Präparat-Komplex in Sekundenschnelle am Schneidetisch festzufrieren. Bei zügiger Arbeitsweise war ein vorübergehendes Auftauen des Präparatinhaltes nicht zu befürchten.

Als Arbeitstemperatur der Wahl wurden für den separat von der Raumtemperatur kühlbaren Kryotisch -30° C ermittelt. Bei tieferen Kältegraden verschlechtert sich die Schneidbarkeit des Gewebes erheblich.

Eine besondere Sorge galt den Schnecken, die durch ihre expo-

nierte Lage beim Schneiden leicht bersten. Um sie zu stabilisieren wurden die Bullae vermittels einer Injektionsspritze mit kaltem Wasser gefüllt, das sofort fror und als Eis den Schnecken den nötigen Halt verlieh.

Das Schneiden des Präparates erfolgt am Kryotom durch vertikales Vorbeiführen des Gewebeblocks am festsitzenden Messer. Die Schichtdicke, gewählt wurden 20 µm, wurde zuvor am Vortrieb eingestellt.

2.8 Mikroskopischer Nachweis von Fluoreszenz

Die interessierenden Flüssigkeitsräume und deren Umgebung wurden nach Spuren des applizierten Farbstoffs abgesucht, sowohl im Kunstlicht des Operationsmikroskops (6 Volt, 50 Watt-Birne) als auch unter ultravioletter Beleuchtung.

Ultraviolett strahlende Lichtquelle war die Mikroskopierleuchte 250 D 1 (Zeiss, Oberkochen), die mit einer Quecksilber-Höchstdrucklampe (HBO 200 W/4, Zeiss) bestückt war. Das Licht gelangte, nach Passage mehrerer Filter, über den Umlenkansatz d 3, der zur Mikroskopierleuchte lieferbar ist, auf das Präparat. Diese sehr beengende Konstruktion wurde später durch einen flexiblen Quarzfaser-Lichtleiter (Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz) ersetzt;

er ist speziell für die Übertragung ultravioletten Lichts ausgerichtet. Sein gewichtigster Vorteil bestand jedoch darin, daß durch die enge Bündelung des Lichts eine wesentlich höhere Leuchtdichte am Objekt erzielt werden konnte. Zum einen verbesserte sich die Nachweisbarkeit von geringen Fluoreszenzen, zum anderen ließ sich die Belichtungszeit bei der Photographie verkürzen.

Der Umgang mit fluoreszierenden Stoffen erfordert einige grundsätzliche physikalische Kenntnisse. Fluoreszenz, eine der beiden Formen der Lumineszenz, ist die Lichtemission eines fluoreszenzfähigen Stoffes, die erfolgt, so lange der Stoff bestrahlt wird; dabei muß die Einwirkung grundsätzlich kürzerwellig, also energiereicher sein als es das emittierte Licht ist. Die einwirkenden Lichtquanten, die aus sichtbaren oder kurzwelligen unsichtbaren Bereichen stammen können, bewirken eine Anhebung von Elektronen aus den inneren Elektronenschalen in unbesetzte Stellen der äußeren Schalen. Beim Rücksprung der Elektronen aus diesem instabilen in den stabilen Ausgangszustand werden Lichtquanten frei, die der Energiedifferenz der beiden Schalen entsprechen.

Da die energetischen Zustände nicht beliebig sind, läßt sich jedem fluoreszenzfähigen Stoff ein Absorptions- und ein Emissionsspektrum zuordnen, wobei beide Spektren Maxima aufweisen.

Für den optimalen Nachweis einer Fluoreszenz ist es erforderlich,

daß der Betrachter lediglich das emittierte, also das durch Fluoreszenz hervorgerufene Licht sieht, nicht aber das anregende Licht, das zu einem beträchtlichen Teil an der Oberfläche des fluoreszierenden Stoffes reflektiert wird.

Speziell am geweblichen Präparat stellen sich dadurch Probleme, daß Knochen selber fluoresziert. Seine Fluoreszenz wird sich dem artefiziell eingebrachten Stoff überlagern und dadurch zu Fehlinterpretationen Anlaß geben, wenn nicht geeignete Filterkombinationen die erforderliche Selektion herbeiführen.

Unter Berücksichtigung der spektralen Zusammensetzung des von der Quecksilberlampe erzeugten Lichts hat sich für unsere Versuchsanordnung folgende Filterkombination als die brauchbarste erwiesen: Vom integrierten Schiebe-Filtersatz des UV-Leuchtenträgers wurde ausschließlich der Erregerfilter UG 1 in den Strahlengang eingeschoben. Sein Hauptdurchlaßbereich liegt zwischen 300 und 400 nm. In diesem Bereich finden sich mehrere Emissionsgipfel der Lampe, von denen der prominenteste, er liegt bei 365 nm, nur zu 50 % gedämpft wird. (Ein zweiter Durchlaßbereich des UG 1-Filters im Rotbereich spielte in diesem Zusammenhang keine Rolle.)

Zwei andere Filter befanden sich ebenfalls ständig im Strahlengang - der Filter KG 1, ein Wärmeschutzfilter und der Filter BG 38,

dessen Durchlaßbereich sich vom Ultravioletten ab ca. 300 nm über einen Steilanstieg erstreckt zu den sichtbaren Frequenzen bis ca. 700 nm, wobei aber vom Gelb-Grünen zum Roten die Durchlässigkeit allmählich abnimmt. Er schützt die nachgeschalteten Filter ebenfalls vor Überhitzung und schwächt störendes Rot.

Diese Filter bewirken die Abgabe von fast reinem UV-Licht.

Ein weiterer Filter wurde als Sperrfilter in den Strahlengang zwischen Objekt und Mikroskop-Objektiv eingeschaltet. Im Idealfall hätte er eine solche Farbkomponente der Rhodamin- bzw. Gamma-Globulinfluoreszenz herausgefiltert, die die umgebenden Strukturen und insbesondere der selber fluoreszierende Knochen nicht aufwies. Allerdings war dies mit einem einzigen Filter nie voll befriedigend zu bewerkstelligen. Weil aber auf die Zwischenschaltung mehrerer Filter wegen zu hohen Lichtverlustes verzichtet werden mußte, entschied man sich für den Filter GG 495 (Schott, Mainz), der für kürzerwelliges als blau-grünes Licht undurchlässig ist. Gegen Ende der experimentellen Untersuchungen wurde er ersetzt durch den Langpaßfilter OG 570 (Schott, Mainz), der das Emissionsspektrum auf Rot und Orange einengt. Eine entscheidende Kontrastanhebung war aber auch durch ihn nicht möglich.

2.9 Dokumentation

Von jedem Präparat, dem kein offensichtlich mißglückter Versuch zugrunde lag, wurden die typischen Schnittebenen photographisch festgehalten und zwar im Licht der Mikroskopierleuchte (bei Überspannung) sowie unter ultravioletter Bestrahlung. Die Spiegelreflexkamera (Contarex, Zeiss, Oberkochen) war dabei über ein Verteilerstück und einen Umlenkspiegel an den Strahlengang des Mikroskops gekoppelt. Belichtet wurde auf den Diapositiv-Film EKTACHROME "high speed" (Kodak, Stuttgart-Wangen) bei seiner Normempfindlichkeit von 22 DIN.

Pro Einstellung wurden 6 verschiedene Belichtungen - meist bei 25-facher Vergrößerung - durchgeführt, jeweils 3 bei UV-Licht und 3 bei Normallicht; damit war eine sichere Dokumentation gewährleistet, und später konnte das optimal belichtete Diapositiv ausgewählt werden. Die Noramallicht-Aufnahmen wurden bei Blende 64 jeweils 1/2, 1/4 und 1/8 Sekunde belichtet, die UV-Aufnahmen bei Blende 16 je nach Fluoreszenzintensität 2, 3 und 4 oder 3, 4 und 5 Minuten.

Zusätzlich wurde ein schriftliches Auswertungsprotokoll geführt; hier wurden auch Ergebnisse festgehalten, die photographisch nicht zu bewältigen waren.

Gewisse Schwierigkeiten ergaben sich aus der Notwendigkeit, die Color-Diapositive in druckfähige Papierbilder umzusetzen. Schlechte Resultate zeigten die Farbabzüge einer Vergrößerungsanstalt bezüglich der Wiedergabe von Fluoreszenzen. Die Schwarzweißbilder des hauseigenen Labors erwiesen sich als überlegen, trotz des zweimaligen Kopiervorgangs. Dennoch kommen manche Feinheiten des Diapositivs nicht zum Ausdruck; dadurch ergeben sich in einigen Fällen bei der Betrachtung der Photographien des Bilderteils im Anhang Divergenzen zur schriftlichen Darlegung der Ergebnisse, die aber für die Aussage der Arbeit nicht von grundlegender Bedeutung sind.

3 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, fanden bei der Darstellung der Ergebnisse nur diejenigen Versuche Berücksichtigung, bei denen sich während der Auswertung am Schneidetisch keine evidenten Fehler nachweisen ließen. Als solche galten beispielsweise Geweberisse, die möglicherweise oder sicher direkt oder indirekt mit den untersuchten Flüssigkeitsräumen in Verbindung standen. Im Einzelfall war es nämlich nicht möglich, die wichtige Entscheidung zu treffen, zu welchem Zeitpunkt die Läsion aufgetreten war. Eine solche wäre aber nur dann bedeutungslos gewesen, wenn sie nach dem Einfrieren entstanden war; wäre sie dagegen vor oder

während der Einfrierprozedur entstanden, hätte sie eine abnorme Farbstoffausbreitung herbeiführen können.

Einer besonders kritischen Auswertung bedurften alle Versuche, bei denen während der Perilymphmarkierung Schwierigkeiten aufgetreten waren. (Dies war im Versuchsprotokoll vermerkt.) Als Fehlerquellen kamen Perilymphverlust durch insuffiziente Abdichtung der cochleären Punktionsstelle in Betracht sowie die Anwendung von Druck bei der Farbstoffinstillation, wenn sich die Spitze der Glaskapillare während des Einführens in den Perilymphraum mit endostalem Gewebe oder mit Gewebekleber verstopft hatte und dieser unliebsame Widerstand überwunden werden mußte.

3.1 Versuchsreihe Ia - Rhodamininstillation in die Basalwindung der Scala tympani

Die jeweils rechte Cochlea von 7 lebenden Meerschweinchen dieser Reihe wurde innerhalb von 30 Sekunden nach Farbstoffapplikation eingefroren. Zwei Präparate wurden verworfen. In einem Fall war die Cochlea gesprungen, die Wände des Risses fluoreszierten; im zweiten Fall war die Reinstillation der markierten Perilymphe überschießend erfolgt mit einem zusätzlichen Einstrom von Paraffinöl aus dem Verbindungsschlauch zur Mikrobürette. Vier der restlichen fünf Präparate boten ein ähnliches Bild - der Farb-

stoff füllte bereits die hirnseitige, trichterförmige Mündung des Aquädukts aus und hatte die Wand des benachbarten Rhombenzephalon erreicht. Innerhalb der Scala tympani war der Farbstoff ungefähr eine Drittelwindung aufgestiegen.

Bei diesen vier Versuchen war die Farbstoffinstillation in keinem Fall mit letzter Präzision erfolgt, daher mußte mit nicht näher bestimmbaren Druckschwankungen gerechnet werden.

Nur bei einem Versuch dieser Serie (Bildtafel IV) hatte das Rhodamin zwar den Trichter erreicht, diesen aber nicht überschritten. Nur knapp die erste Viertelwindung der Scala tympani zeigte Fluoreszenz. Hier war die Markierung nahezu optimal gelungen; lediglich bei der Aspiration in die Glaskapillare hatte die aufsteigende Perilymphe die 0,1 μl-Marke geringfügig überschritten.

Bei allen fünf Tieren konnte entlang des 8. Hirnnerven keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Weitere 3 Versuche wurden mit einer Laufzeit von 60 Sekunden angesetzt; davon war einer - mit Einschränkung - verwertbar (Bildtafel V); vor der Abdichtung mit Tesafilm und Histoacryl trat ein großer Tropfen Perilymphe an der Bohrstelle aus, außerdem erfolgte die Reinjektion etwas überschießend, das heißt, daß den 0,1 μl aspirierte Perilymphe eine geringe Menge Luft nachströmte.

Im UV-Licht war das Rhodamin im Trichter und dem angrenzenden Subarachnoidalraum nachweisbar, berührte aber das Hirn noch nicht. Innerhalb der Schnecke war der Farbstoff eine halbe Windung aufgestiegen.

Beim zweiten Tier dieser Serie war ein Verlust von zwei großen Tropfen Perilymphe aufgetreten. Außerdem war wegen eines Widerstandes in der Glaskapillare zur Reinjektion die Anwendung von Druck erforderlich. Nachdem der Widerstand überwunden war, kam es auch hier zu einem überschießenden Einstrom von insgesamt etwa 1,0 µl Perilymphe und Luft. Entsprechend der großen Volumenschwankung erreichte die Fluoreszenz deutlich den Hirnmantel und war innerhalb des ersten Drittels der Basalwindung der Scala tympani nachweisbar.

Bemerkenswert ist der letzte dieser 3 Versuche. Intraoperativ war der Nervus facialis gezerrt worden. Neben einem reichlichen Perilymphabfluß in den Liquorraum fanden sich deutlich Spuren von Rhodamin entlang des Nervus cochlearis.

Wiederum 3 lebende Tiere wurden nach einer Laufzeit von 3 Minuten eingefroren. Wegen frakturierter Stapesfußplatte war ein Versuch nicht verwertbar. Die beiden anderen zeigten ein weitgehend übereinstimmendes Ergebnis (Bildtafel VI): Via Aquädukt war die markierte Perilymphe in den Liquorraum abgeflossen, reichte deutlich an das dem Trichter benachbarte Hirn und wies in einem

Fall eine Ausbreitungstendenz im Subarachnoidalraum in kaudaler Richtung auf. In der Scala tympani erreichte die Fluoreszenz jeweils knapp das Ende der ersten Halbwindung.

Analoge Resultate ergaben zwei von drei Versuchen mit 5 Minuten Laufzeit (Bildtafel VII). Die markierte Perilymphe war bis zum Liquorraum zu verfolgen und zeigte fluoreszente Ausläufer nach rostral; bei einem der Tiere allerdings auch minimale Spuren nach kaudal. Die erste Viertelwindung der Scala tympani wies Fluoreszenz auf.

Beim dritten Tier war über den Trichter hinaus keine Fluoreszenz nachweisbar, wohl aber entlang der Scheide des 8. Hirnnerven. Der ipsilaterale Nervus facialis war bei der Operation leicht gezerrt worden.

Auch in der Serie mit 10 Minuten Laufzeit erbrachten zwei Versuche weitgehend deckungsgleiche Resultate, die sich im übrigen nur unwesentlich von den vorbeschriebenen aus der 5-Minuten-Gruppe unterschieden; lediglich innerhalb der Scala tympani war jetzt die Fluoreszenz nicht ganz bis zum Ende der ersten Halbwindung nachzuweisen.

Beim dritten Tier waren alle Skalen aller Windungen stark fluoreszent, ebenso die Neuralscheide des Hörnerven. Während dieses

Experiments war aufgefallen, daß die Perilymphe zwar wie üblich selbständig in die Kapillare aufgestiegen war, dann aber - ohne jegliches Zutun - nahezu vollständig wieder in die Scala tympani eingesaugt wurde. Da lupenmikroskopisch betrachtet keine Gewebeläsion vorlag, kommt als Ursache des Phänomens am ehesten eine Blessur des Gesichtsnerven in Betracht, zumal es sich um einen der ersten Versuche gehandelt hatte, bei denen diese Fehlerquelle noch nicht die gebührende Beachtung fand.

Unter der Aufarbeitung am Kryotom zeigte sich beim vierten Tier dieser Serie, daß bei der Farbmarkierung Öl aus dem Mikromanipulator-System in die Cochlea eingedrungen war; das Präparat wurde verworfen.

3.2 Versuchsreihe Ib - Applikation von Fluorescein-markierten Globulinen in die Basalwindung der Scala tympani

Diese Gruppe beschränkt sich auf zwei Tierexperimente mit den Versuchszeiten 3 und 5 Minuten. Bei beiden fand sich eine scheinbar geringere Ausbreitung der markierten Perilymphe im Vergleich zu den entsprechenden Experimenten, bei denen mit Rhodamin gefärbt worden war.

Nach 3 Minuten waren Spuren der Globuline im Aquädukt nachweis-

bar, nicht aber im Trichter. Longitudinal war ein Aufstieg innerhalb der Scala tympani nur zu drei Vierteln der ersten Halbwindung erfolgt.

Nach 5 Minuten wiesen der Trichter und der unmittelbar benachbarte Subarachnoidalraum Fluoreszenz auf, ebenso die gesamte erste Halbwindung der Scala tympani. Diese Versuchsreihe wurde wegen Unzulänglichkeiten der Methode abgebrochen. Einzelheiten werden im Kapitel "Diskussion" erörtert.

3.3 Versuchsreihe Ic - Tote Kontrolltiere

Drei Tiere wurden unmittelbar nach Rhodamininstillation in die rechte Cochlea eingefroren. In einem Präparat ließ sich die Fluoreszenz bis zur Aquäduktmitte nachweisen. In der Aszendenz hatte der Farbstoff die erste Viertelwindung der Schnecke etwas überschritten. Außer den Wänden der Scala tympani fluoreszierte auf gleicher Höhe das Ligamentum spirale in seiner gesamten Breite, also auch auf der vestibulären Seite (Bildtafel VIII). Ein nicht näher identifizierbares Kanälchen ließ sich anhand seiner Fluoreszenz von der Scala tympani bis an den Modiolus verfolgen.

Beim zweiten Tier gelangte lediglich eine geringe Menge des Farbstoffs in die tympanale Perilymphe. Deswegen konnte die Rhodamin-

verbreitung besser direkt am Kryotom als im dokumentierenden Diapositiv beurteilt werden. Unter direkter Betrachtung des Präparates ließen sich in gewissem Umfang noch Fluoreszenzen ausmachen, die trotz Anwendung der beschriebenen Filter auf der Filmschicht keinen Kontrast mehr hinterließen.

Die unmittelbare Auswertung des Versuchs ergab auch in diesem Fall eine Farbstoffausbreitung bis zur Aquäduktmitte; in der Schnecke war das Rhodamin in nächster Nähe des Applikationsortes verblieben - ohne wesentliche Aszendenz. Auf der Seite der Scala vestibuli zeigte sich am Ligamentum spirale keinerlei Fluoreszenz.

Eine Verwertbarkeit des dritten Experiments schien nicht gegeben, weil die applizierte Rhodaminmenge noch geringer war als im zweiten der Versuche. Ursache der Unterdosierung war in den beiden letztgenannten Fällen ein anderer Füllmodus bei der Präparierung der Glaskapillare. Nach dieser ursprünglich von GIEBEL (1974) beschriebenen Methode wurde Rhodamin in ungelöster Form in die Kapillare eingebracht. Hauptsächlich wegen dem Mangel der nicht exakt quantifizierbaren Menge wurde diese Methode nach wenigen Versuchen aufgegeben und durch die Gefriertrocknung ersetzt.

Die Empfindlichkeit des kommunizierenden Systems von cerebrospinaler und perilymphatischer Flüssigkeit auf Druck- und Volumen-

schwankungen demonstriert ein Versuch, der mit einer Laufzeit von 10 Minuten angesetzt worden war. Das Versuchstier war zu Beginn des Experiments wenigstens eineinhalb Stunden tot. Nach zunächst planmäßig durchgeführter Operation zeigte sich die eingesetzte Kapillare schwergängig. Die Perilymphaspiration ließ sich nur unter Anwendung von Sog bewerkstelligen; zur Reinjektion mußte Druck angewandt werden. Dementprechend weitläufig gestaltete sich die Farbstoffausbreitung. Innerhalb der Scala tympani fand sich Fluoreszenz bis über die basale Halbwindung apikalwärts; endocraniell ließ sich Rhodamin über den Trichter hinaus bis an den Hirnmantel verfolgen, mit deutlicher Ausbreitungstendenz nach rostral.

3.4 Versuchsreihe II - Rhodaminapplikation in die 3. Windung der Scala tympani

Diese Versuchsreihe umfaßt 9 Versuche an lebenden und 3 Versuche an toten Meerschweinchen mit Laufzeiten von 2 Minuten bis zu einer Stunde.

Nach 2 Minuten konnte Fluoreszenz an den Wänden der 2. und 3. Windung der Scala tympani nachgewiesen werden, keine dagegen in der 4. Windung. Fluoreszenzspuren reichten bis an den Modiolus.

3 Tiere wurden nach 5 Minuten eingefroren. Die Farbstoffverteilung glich bei 2 Tieren im wesentlichen der des 2-Minuten-Versuchs. Im 3. Fall war bei der Rhodamininstillation Druck angewandt worden - außer den tympanalen Wänden der 2., 3. und 4. Windung fluoreszierte auch die Wand der 3. vestibulären Windung.

Nach 10 Minuten Laufzeit fluoreszierten die tympanalen und die korrespondierenden vestibulären Wände von der Mitte der 2. Windung bis oberhalb der Injektionsstelle in der 3. Windung. Rhodaminspuren reichten an den Modiolus.

Zu wenig Fluoreszenz für eine sichere Beurteilung der Ausbreitung lag bei den Tieren vor, die 1 Stunde nach Markierung eingefroren worden waren. In der Direktaufsicht konnten nur noch kaum mehr wahrnehmbare Fluoreszenzspuren an den Wänden der 2. bis 4. Windung der Scala tympani ausgemacht werden.

3.5 Versuchsreihe IIIa - Rhodaminapplikation auf das Runde Fenster

Diese Versuchsreihe wurde an 12 lebenden Meerschweinchen durchgeführt. Die Laufzeiten betrugen wenige Sekunden bis 10 Minuten.

Ein Tier wurde innerhalb von 5 Sekunden nach Aufbringen eines

Tropfens der 2 %igen Rhodamin B-Lösung eingefroren. Innerhalb dieser kurzen Zeit hatte der Farbstoff die Fenstermembran noch nicht passiert (Bildtafel IX).

Nach 1 Minute bereits ließ sich innerhalb der Schnecke Rhodamin in der Gegend der Membrana tympani secundaria nachweisen; es hatte die cochleäre Mündung des Aquädukts eben erreicht, der Aquädukt selber war fluoreszenzfrei (Bildtafel X).

Nach 3 Minuten wies ein längerer Abschnitt des Aquädukts Fluoreszenz auf, seine trichterförmige endocranielle Öffnung war jedoch noch nicht ganz erreicht. Innerhalb der Schnecke war eine Aszension um knapp ein Achtel der Basalwindung der Scala tympani zu beobachten (Bildtafel XI).

Vier Tiere mit einer Laufzeit von jeweils 5 Minuten zeigten im wesentlichen gleiche Ergebnisse. Der Farbstoff hatte via Aquädukt den Trichter erreicht (Bildtafel XII). In einem Fall mit insgesamt überdurchschnittlicher Fluoreszenzintensität bestand ein zarter Farbstoffausläufer aus dem Trichter in kaudaler Richtung innerhalb des Subarachnoidalraums. Innerhalb der Scala tympani war ein ganz geringer Weiteraufstieg erfolgt.

Drei Tiere wurden nach 10 Minuten eingefroren. Insgesamt war gegenüber den 5-Minuten-Tieren eine Zunahme der Fluoreszenzintensi-

tät im Subarachnoidalraum und am benachbarten Hirnmantel zu beobachten. Aus dem Trichter zogen Farbstoffausläufer nach kaudal und rostral. - Eine weitergehende Aszension des Farbstoffs innerhalb der Schnecke im Vergleich zu den 5-Minuten-Tieren war nicht erfolgt (Bildtafel XIII). Die Fluoreszenz innerhalb der Schnecke - außer direkt am Runden Fenster - zeigte eine ungleich geringere Intensität als die im Subarachnoidalraum.

An drei weiteren Tieren wurde untersucht, ob sich eine Änderung der Kopfhaltung des Tieres auf die Farbstoffausbreitung auswirkt. Diese Tiere wurden sofort nach der Applikation des Rhodamintropfens auf die markierte Seite gelegt. Die Ergebnisse nach Laufzeiten von 5 und 10 Minuten entsprachen in vollem Umfang den Resultaten der Versuche, bei denen während der gesamten Laufzeit das operierte Ohr oben lag.

3.6 Versuchsreihe IIIb - Totes Kontrolltier

Beim lebenden Tier hatte sich herausgestellt, daß nach 3 Minuten der Farbstoff annähernd den Trichter erreicht. Die Kontrolle wurde auf ein Tier, das etwa 100 Minuten tot war, beschränkt; die Laufzeit betrug 3 Minuten.

Die Auswertung ergab, daß das Rhodamin durch das Runde Fenster

eingedrungen war; es erreichte eben die cochleäre Mündung des Aquädukts, dieser selber war in seiner gesamten Länge frei von Fluoreszenz. Innerhalb der Scala tympani war der Farbstoff ein Drittel der 1. Halbwindung aufgestiegen (Bildtafel XIV).

3.7 Versuchsreihe IV - Applikation von Rhodamin diffus in die Bulla (transmyringeal).

Die beiden Tiere mit 12 und 16 Minuten Laufzeit zeigten ein vergleichbares Resultat. Reichlich Fluoreszenz fand sich im Trichter und dem ihm benachbarten Subarachnoidalraum. Longitudinal war Rhodamin in der ersten Halbwindung beider perilymphatischer Skalen nachweisbar, vom Runden und Ovalen Fenster ausgehend in abnehmender Konzentration. Fluoreszenzfrei war der Anfang der 2. Windung der Scala tympani, dagegen wies in einem Fall das Mittelstück dieser Windung wieder reichlich Rhodamin auf; an dieser Stelle mündete ein Knochenkanälchen der Bulla. Weiterhin fanden sich beim selben Tier der Anfang der 2. Windung der Scala vestibuli und die 4. Windung dieser Scala gefärbt (Bildtafel XV).

3.8 In-vitro-Versuche zur Ausbreitung von Rhodamin per diffusionem

Anhand dieser Versuche sollte der Einfluß der Temperatur auf die

Diffusionsgeschwindigkeit von Rhodamin überprüft werden, da zwischen toten Tieren, die bei Zimmertemperatur gelagert wurden und lebenden eine Temperaturdifferenz von ca. 12^{o} C bestand. Dazu wurden Schmelzpunktbestimmungsröhrchen mit Humanserum gefüllt; anschließend ließ sich noch mittels Kapillarkräften an einem Ende der Röhrchen eine 2 mm hohe Säule einer 2 %igen Rhodaminlösung einbringen. Diese Röhrchenenden wurden mit Plastilin verschlossen. Die Diffusion wurde unter Glühlampen- und ultravioletter Beleuchtung beobachtet und ausgemessen.

Die Verlaufsbeobachtung über eine Stunde ergab, daß bei 37^{o} C die Diffusion lediglich um den unbedeutenden Faktor 1,05 schneller vonstatten ging als bei Zimmertemperatur. (Standardabweichung dieser Versuche: 0,05, entsprechend 5 %.) Arithmetisch ergibt sich nach der Fick'schen Gleichung der Faktor 1,04.

4 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen jene Autoren, die einen intracochleären Entstehungsort der Perilymphe annehmen, nicht nur bei Primaten, deren Aquädukt bei den meisten Individuen physiologischerweise ohnehin obliteriert ist, sondern auch bei

niedrigeren Mammalia, wie beispielsweise dem hier untersuchten Meerschweinchen, dessen Aquädukt weit offen ist und dessen Perilymphe daher ein Derivat der cerebrospinalen Flüssigkeit sein könnte.

CHILOW (1923), MEURMAN (1929), GISSELSON (1949), SCHREINER (1963) und NEIGER (1968) haben auf die Empfindlichkeit des kommunizierenden Systems von CSF und Perilymphe gegen Druckänderungen hingewiesen. Jede experimentelle Studie, die sich mit dem Strömungsverhalten dieser Flüssigkeiten befaßt, darf deshalb nur unter der Voraussetzung durchgeführt werden, daß die Druckverhältnisse möglichst wenig, besser noch, überhaupt nicht gestört werden, das heißt, das System der kommunizierenden Flüssigkeiten darf zu keinem Zeitpunkt eröffnet werden, solange es sich in flüssigem Zustand befindet.

Die vorliegende Arbeit ist eine Ergänzung der von GIEBEL u.a. (1976) und KOMMOSS (1977) veröffentlichten Ergebnisse, wonach geringste Mengen (0,2 ng) von Rhodamin B, unter minimaler Volumenverschiebung von 0,1 µl suboccipital appliziert, beim lebenden Tier nicht den Aquaeductus cochleae passieren und damit nicht in der Cochlea erscheinen, wohl aber beim toten Tier.

Dem Ansatz nach die gleiche Methodik fand in der Versuchsreihe I Anwendung. Die Ergebnisse sind auf Bildtafel XVI schematisch zu-

sammengefaßt. Dabei stellt sich zwar mit fortschreitender Zeit eine Anreicherung des in die Basalwindung der Scala tympani eingebrachten Farbstoffes im Subarachnoidalraum dar, aber eine exakte Korrelation von abgelaufener Zeit nach Applikation und übergetretener Farbstoffmenge ist nicht gegeben. Nur dadurch wäre aber eine Strömung durch den Aquädukt bewiesen.

Anders jedoch in der Versuchsreihe III (Bildtafel XVII); hier wurden die Druckverhältnisse des Systems nicht gestört; der Farbstoff war per diffusionem durch die Membran des Runden Fensters in die Perilymphe der Scala tympani gelangt. Es läßt sich eine enge Beziehung zwischen vergangener Zeit und Voranschreiten des Rhodamins zum Subarachnoidalraum herstellen. In 5 Minuten war der "Trichter" nur knapp erreicht. Dagegen war beim toten Kontrolltier der gesamte Aquädukt noch frei von Fluoreszenz. Demzufolge muß beim lebenden Tier eine zum Subarachnoidalraum gerichtete Strömung durch den Aquädukt angenommen werden, denn, wäre die Farbstoffausbreitung lediglich auf den physikalischen Vorgang der Diffusion zurückzuführen, dürfte trotz der Temperaturdifferenz zwischen lebendem und totem Tier die Differenz in den Ausbreitungsstrecken nicht so gravierend sein; wie der In-vitro-Versuch gezeigt hatte dürfte bei dem vorhandenen Temperaturunterschied die Farbstoffverteilung beim lebenden Tier allenfalls um den Faktor 1,05 schneller sein. Das Schaubild zeigt auch, daß innerhalb der Scala tympani kein großer Unterschied

in der Farbstoffverteilung zwischen lebendem und totem Tier besteht, dagegen ist der Unterschied der Ausbreitungsstrecken innerhalb des Aquädukts evident.

Selbstverständlich heißt dies nicht, der Anteil der Diffusion an der Farbstoffausbreitung sei vernachlässigbar klein; lediglich das "Mehr" beim lebenden Tier muß Folge einer Strömung sein. Da eine cochleo-fugale Strömung im Aquädukt notwendigerweise auch eine basalwärts gerichtete Strömung in der Scala tympani nach sich ziehen muß, steht die apikalwärts gerichtete Farbstoffausbreitung dazu in scheinbarem Widerspruch. Vergegenwärtigt man sich jedoch das Fassungsvermögen des Aquädukts im Vergleich zu dem des tympanalen Perilymphraums in der Basalwindung, so ist leicht einzusehen, daß eine Flüssigkeitsverschiebung um das Fassungsvermögen des Aquädukts innerhalb von mindestens 3 bis 5 Minuten die Flüssigkeitssäule innerhalb der Basalwindung in nicht merklichem Ausmaß betreffen wird. Demzufolge kann sich der Farbstoff innerhalb der Basalwindung praktisch ohne Gegenströmung per diffusionem ausbreiten.

Diese Volumenverhältnisse veranschaulicht ein Schema von FERNANDEZ (1952), dem der Aquädukt in Länge (Ordinate) und Querschnitt (Abszisse) getreu angefügt wurde (Abb. 3). Dabei wurden eigene Aquäduktlängenbestimmungen (s.a. Bildtafel I) zugrunde gelegt, die mit denen von HAUG et al. (1978) übereinstimmen. Als Aquä-

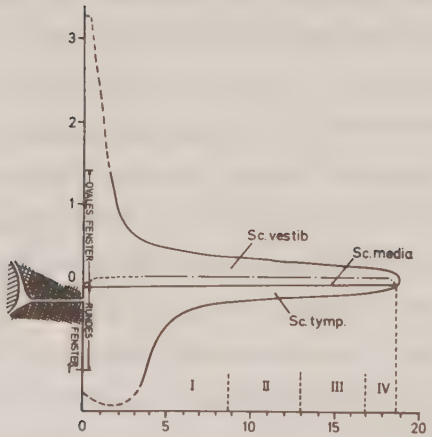


Abb. 3 Darstellung der Längen- und Volumenverhältnisse, Schneckenskalen und Aquädukt im Vergleich. (Nach FERNANDEZ.)

duktlänge ergaben sich dabei 3 mm, ohne die trichterförmige endocranielle Öffnung.

Theoretisch denkbar war eine Verfälschung der Ergebnisse dadurch,

daß eine bestimmte Kopfhaltung des Tieres Einfluß auf die Farbstoffverteilung gehabt hätte. Es wurde nachgewiesen, daß dies nicht der Fall ist, wie bereits in der Darstellung der Ergebnisse erwähnt.

Jene Versuche, bei denen farbstoffmarkierte Globuline angewandt wurden, dürfen nur mit vielen Vorbehalten interpretiert werden, sowohl bei Anwendung in der Basalwindung, besonders aber in der 3. Windung. Diese Versuche wurden bald abgebrochen, weil die Nachteile der Methode, die in apikalen Bereichen ohnehin operativ delikat ist, ihren Nutzen überproportional abwerten. Bestechend ist zwar, daß mit dem Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierten Globulin ein relativ großes Molekül vorliegt, das sich wegen seiner geringen Diffusionsbestrebungen hervorragend als Indikator einer Strömung eignet und das darüberhinaus eine präsente Fluoreszenz aufweist, die intensiver ist als die Eigenfluoreszenz einer wässrigen Rhodaminlösung; die Fluoreszenzdichte von Rhodamin B steigt jedoch sprunghaft an, sobald dieses sich mit Lipoproteinen verbindet und es erreicht in diesem Zustand der Komplexverbindung eine Leuchtkraft und damit eine Nachweisbarkeit, die derjenigen für markierte Globuline um wenigstens drei Zehnerpotenzen überlegen ist.

Eine andere Unzulänglichkeit des Globulins beruht darin, daß sich das Emissionsspektrum seiner Fluoreszenz weitgehend mit dem der

Knocheneigenfluoreszenz deckt und damit zu erheblichen Identifikationsproblemen führt. Diese negativen Eigenschaften, unzureichende Fluoreszenz bei ungünstiger Wellenlänge, können nur durch eine kostenaufwendige Erweiterung der Versuchsanordnung gemildert werden. Das Licht muß, hohe Leuchtkraft vorausgesetzt, vermittels geeigneter Filterkombinationen auf Spaltbreite in den Bereich des Absorptionsgipfels von Fluorescein-markiertem Globulin eingeengt werden; ferner bedarf die optisch-rezeptive Seite der Anlage einer entsprechenden spektralen Beschränkung auf einen Emissionsgipfel, der ausreichend weit entfernt ist vom Wellenbereich der Knocheneigenfluoreszenz.

Die Resultate der Versuchsreihe II (Farbstoffapplikation in die Scala tympani der 3. Windung) können nach diesen Ausführungen bestenfalls als vager Hinweis auf eine apico-basale Strömung in diesem Bereich gedeutet werden. Die Fortsetzung dieser Versuche, die durchaus wünschenswert wäre, ist nur sinnvoll, wenn die Methodik weiter verfeinert wird.

4.1 Vergleich mit anderen Autoren

Einer Vielzahl experimenteller Studien, bei denen Markierungsstoffe suboccipital injiziert wurden - Literaturübersichten finden sich bei NEIGER (1968), ORSULAKOVA (1975) und ARNOLD und VOSTEEN

(1979) - stehen vergleichsweise wenige Untersuchungen gegenüber, die von der cochleären Seite ausgehen. Ungeachtet der Versuchsansätze sind die Resultate widersprüchlich, ob und in welcher Richtung ein aktiver Austausch zwischen perilymphatischer und cerebrospinaler Flüssigkeit durch den Aquaeductus cochleae stattfindet. Experimente, die die hohe Empfindlichkeit des kommunizierenden Systems auf Druckschwankungen nicht gebührend berücksichtigen, müssen generell abgelehnt werden, wenn aus ihnen Aussagen über eine Strömungsrichtung abgeleitet werden.

Immerhin wies bereits CHILOW (1923) darauf hin, daß Methylenblau, einer Katze suboccipital injiziert, nur dann die Scala tympani erreicht, wenn das Runde Fenster eröffnet wird. Entsprechend ist die Beobachtung von MEURMAN (1929), daß sich in den Spinalkanal des Kaninchens injizierte Tusche in Abhängigkeit vom angewandten Druck weit in die Perilymphe treiben läßt. GISSELSON (1949) sah 30 Minuten nach intrathekaler Fluoresceinapplikation bei der Katze keine Fluoreszenz am Runden Fenster, jedoch sofort, nachdem dieses punktiert wurde und Perilymphe abfließen konnte. Er schloß jedoch voreilig aus der Tatsache, daß nach 1 Stunde auch am nicht eröffneten Fenster schließlich Fluoreszenz erscheint, daß sich die Perilymphe überwiegend vom Liquor ableite.

ALTMANN und WALTNER (1947) verwendeten bei ihren Versuchen an Kaninchen 0,5 - 1 ml Eisensalzlösung bzw. Hühnererythrozyten-

suspension, instillierten diese Substanzen nach Entnahme der gleichen Menge Liquors suboccipital und sprachen von druckfreier Applikation. Die Markierungsstoffe fanden sich in beiden perilymphatischen Skalen; die Autoren schlossen auf eine Strömung vom Subarachnoidalraum zum Innenohr. Nach weiteren Untersuchungen (1950 a, 1950 b) - auch an Katzen und Affen - haben beide Autoren diese Ansicht jedoch weitgehend revidiert.

ARNVIG (1951) und KLEY (1951), die eine cochleawärts gerichtete Strömung durch den Aquädukt annehmen, machen für ihre Markierungsversuche keine Mengenangabe über die benutzten Substanzen (verschiedene Farbstoffe).

V. SVANE-KNUDSEN (1958) injizierte bei Meerschweinchen 0,3 ml Eisensalzlösung suboccipital. Ähnlich hohe Mengen wandten JAKO et al. (1959), SCHUKNECHT und SEIFI (1963), SANDO (1971), ARNOLD und v. ILBERG (1971), ANGELBORG (1973) und ARNOLD (1974) an. KOMMOSS (1977) allerdings berichtet, daß 0,05 ml Tusche, suboccipital beim Meerschweinchen injiziert, innerhalb von 2 - 4 Sekunden eine intensive Schwarzfärbung am Runden Fenster bewirke.

10 - 50 µl radioaktiver Substanzen verwendeten HUGHES und CHOU (1963), 15 µl radioaktiv markierten Inulins bzw. Mannitols ORSULAKOVA (1975) und sprachen sich für eine cochleopetale Strömung durch den Aquädukt aus. Wie alle anderen Experimentatoren hatten

auch sie das System zu irgendeinem Zeitpunkt der Versuchsdauer eröffnet, sei es bei der Markierung oder zur Probenentnahme.

Mit einer Quantität an Farbstofflösung, die um den Faktor 100 bis 10 000 geringer ist als die aller bisher genannten Autoren, kamen GIEBEL et al. (1976) aus, nämlich mit nur 0,1 µl Rhodamin. Sie sahen ein Eindringen des Farbstoffs nie bei lebenden, wohl aber bei toten Meerschweinchen.

Eisensalz direkt in die Scala tympani injizierte Young (1949) beim Rhesusaffen. Subarachnoidal ließ sich der Farbstoff nicht nachweisen. Dabei sei auf die anatomische Besonderheit des bei Primaten gewöhnlich verschlossenen Aquädukts noch einmal hingewiesen. 100 µl des gleichen Stoffes instillierten ALTMANN und WALTNER (1950) bei der Katze und fanden ihn via Aquädukt und via Meatus acusticus internus zum Subarachnoidalraum ausgebreitet.

Bemerkenswert sind die Beobachtungen von SCHREINER (1963), der feststellte, zu welch unterschiedlichen Ergebnissen unterschiedliche Arbeitsmethoden führen. Bei Katzen fand er eine Stunde nach suboccipitaler Injektion von radioaktiven Ionen einen Aktivitätsausgleich zwischen CSF und Perilymphe, wenn im Zeitstufenversuch von 5 Minuten bis zu einer Stunde flüssige Perilymphproben entnommen wurden. Bei Verwendung von Jod-markiertem Human-

albumin (Molekulargewicht ca. 60 000) anstelle von Phosphorionen betrug die Aktivität der Perilymphe im gleichen Zeitraum immerhin noch 68 %. Wurde bei der Detektion die Perilymphe jedoch nicht flüssig, sondern in gefrorenem Zustand gewonnen, fanden sich in der Perilymphe nur noch 9 % der Liquoraktivität und im Falle des markierten Humanalbumins keine Aktivität. Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich, welche Folgen die Störung der Druckverhältnisse - in diesem Fall durch Eröffnen des Labyrinthes - hat.

ALTMANN und WALTNER (1950 a, 1950 b) kamen, nachdem sie nicht nur in die Scala tympani appliziertes Eisensalz im Subarachnoidalraum wiederfanden, sondern auch suboccipital eingebrachtes in der Perilymphe, schließlich zu dem Schluß, daß physicochemische Faktoren die Ursache dieser Verteilung seien und zwischen CSF und Perilymphe keine physiologischen Strömungen bestünden.

Mehrere Studien befassen sich mit der Frage, welchen Weg Stoffe nehmen, die diffus in die Bulla eingebracht werden. So fanden QUIX und v. EGMOND (1933), der Hauptzugangsweg vom Mittel- ins Innenohr für eine Cocain-Eisensalzlösung seien bei lebenden Meerschweinchen präformierte Knochenkanälchen und nur in geringem Umfang das runde, kaum aber das ovale Fenster; bei toten Tieren nur das runde Fenster. Sie konnten jedoch den Farbstoff, der in

die Scala tympani gelangt war, nur in einem peripheren Abschnitt des Aquädukts nachweisen und nie durchgehend bis zum Subarachnoidalraum verfolgen. Allerdings fanden sie auch nicht den gegenläufigen Weg, sofern der Markierungsstoff durch die Schädelbasis in die CSF gelangt war und in der zentralen Aquäduktmündung vorgefunden wurde.

Das Runde Fenster als Hauptzugangsweg vom Mittel- zum Innenohr wiesen für Tetracyclin MAASS und STUPP (1974) und HAUG et al. (1978) nach, beide Autorengruppen an Meerschweinchen. Nach MAASS und STUPP erfolgt auf diffuse Instillation des Antibioticums in die Bulla der Tiere vom Runden Fenster aus neben einer transversalen eine longitudinale, helicotremawärts gerichtete Ausbreitung. Erst nach 12 Stunden könne es in knöchernen Anteilen der Schnecke nachgewiesen werden.

Dagegen fanden HAUG et al., daß bereits 10 Minuten nach diffuser Applikation von Tetracyclin in die Bulla die Lymphen der Spitzenwindung gefärbt sind, während die der 2. und 3. Windung keinerlei Fluoreszenz aufweisen. Es bestehen demnach auch für Tetracyclin Zugangswege vom Mittelohr durch den Knochen ins Innenohr. Mit unseren Ergebnissen deckt sich der Befund dieser Autoren, daß die Farbstoffausbreitung vom Runden Fenster aus schneller via Aquädukt zum Subarachnoidalraum erfolgt als helicotremawärts innerhalb der Schnecke.

Unberührt von einem üblicherweise stattfindenden Abfluß der Perilymphe durch den Aquädukt bleiben Beobachtungen, daß subarachnoidale Blutungen zu einem Erythrozytenübertritt in die Cochlea führen, weil hierbei wiederum die Druckverhältnisse gestört werden (FEDERSPIL und GLOEBEL, 1974); ebenso erklärbar erscheint, daß größere Mengen radioaktiver Lösungen, suboccipital injiziert, zunächst eine geringe Aktivität der Perilymphe in Relation zum Liquor bedingen, im Laufe von mehreren Stunden aber eine vielfach höhere, wenn man davon ausgeht, daß die Elimination im Liquor weitaus schneller vonstatten geht - teils durch Verteilung im Liquorraum, insbesondere aber auch durch Aufnahme in die Blutbahn.

Welches Ausmaß jedoch die Lymphproduktion im Perilymphraum annehmen kann verdeutlicht eine Studie von KELLERHALS (1976), die bewußt unter völlig unphysiologischen Voraussetzungen durchgeführt wurde. Nach Anfärbung des Liquors cerebrospinalis wurde dem vestibulären Perilymphraum sukzessive Lymphe entnommen. Obwohl Hirnliquor frei nachströmen konnte, wiesen die entnommenen Perilymphproben maximal 36 % der korrespondierenden Farbstoffkonzentration der CSF auf.

Diese Ausführungen machen deutlich, welche Vorsicht geboten ist bei der Obertragung experimenteller Befunde auf physiologische Verhältnisse. Dies gilt genauso für die vorliegende Arbeit. Immer-

hin liegt aber mit der Untersuchung von GIEBEL und KOMMOSS (1978) eine gewichtige Absicherung der Ergebnisse vor, indem sie gezeigt haben, daß im Liquor gelöstes Rhodamin in seinem natürlichen Bestreben, in den Aquädukt hineinzudiffundieren, beim lebenden - und nur beim lebenden - Meerschweinchen gehindert wird.

5 Zusammenfassung

Zur Beantwortung der Frage, ob physiologischerweise eine Perilymphströmung durch den Ductus perilymphaticus des Meerschweinchens vorliegt, wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden die Lymphe der Scala tympani markiert. Als Farbstoff wurde Rhodamin verwendet, das durch seine Fluoreszenzfähigkeit im ultravioletten Licht auch in geringen Mengen nachgewiesen werden kann.

Hervorstechendstes Merkmal des kommunizierenden Systems von CSF und Perilymphe ist seine Empfindlichkeit auf Druckschwankungen. Dies zeigt sich bereits bei der Instillation von nur 0,1 µl der Markierungssubstanz in die tympanale Perilymphe der basalen Schneckenwindung. Dieser Tatsache wurde Rechnung getragen, indem der Farbstoff lediglich auf die Membran des Runden Fensters aufgetragen wurde und somit in die Perilymphe diffundieren konnte; dadurch waren Druckschwankungen aufgrund einer Eröffnung des

Systems ausgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe weisen darauf hin, daß eine physiologische Strömung durch den Aquädukt zum Subarachnoidalraum beim Meerschweinchen existiert und somit die Perilymphe ausschließlich im Perilymphraum selber gebildet wird.

6 Literaturverzeichnis

1. ALTMANN, F. and J.G. WALTNER: The circulation of the Labyrinthine Fluids; Ann. Otol. Laryng. 56, 684-708 (1947).

2. ALTMANN, F. and J.G. WALTNER: New investigations on the Physiology of the Labyrinthine Fluids; Laryngoscope 60, 727-739 (1950 a).

3. ALTMANN, F. and J.G. WALTNER: Further investigations on the Physiology of the Labyrinthine Fluids; Ann. Otol. Rhinol. Laryng. 59, 657-686 (1950 b).

4. ANGELBORG, C.: Distribution of macromolecular Tracer Particles (Thorotrast) in the Cochlea. An Electron Microscopic Study in Guinea Pig; Acta otolaryng. (Stockh.) Suppl. 319 (1973).

5. ANSON, B.J., J.A. DONALDSON, R.L. WARPEHA and T.R. WINCH: A critical Appraisal of the Anatomy of Perilymphatic System in Man; Laryngoscope 74, 945-966 (1964).

6. ARNOLD, W.: Zur Frage der Produktion und Resorption der Perilymphe (Lymphabfluß des Innenohrs); Z. Laryng.-Rhinol. 53, 774-790 (1974).

7. ARNOLD, W. und C.v. ILBERG: Verbindungswege zwischen Liquor und Perilymphraum; Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 198, 247-261 (1971).

8. ARNOLD, W. und K.-H. VOSTEEN: Zur Physiologie von Perilymphe und Endolymphe; In: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde in Praxis und Klinik; Band 5; Hrsg. J.Berendes, R.Link und F.Zöllner; Thieme, Stuttgart (1979).

9. ARNVIG, J.: Relation of the Ear to the Subarachnoid Space and Absorption of the

Labyrinthine Fluid;
Acta otolaryng. (Stockh.) Suppl. 96 (1951).

10. CHILOW, K.L.: Zur Frage über den Ausgleich des Labyrinthdruckes;
Z. Hals-Nas.-Ohrenheilk. 5, 404-414 (1923).

11. COTUGNO, G.: De aquaeductibus auris humani internae;
Wien (1774).

12. DU VERNEY, J.G.: Tractatus de organo auditus;
Nürnberg (1684).

13. FEDERSPIL, P. und B. GLOEBEL: Über die Zusammenhänge zwischen Liquor cerebrospinalis und Innenohrflüssigkeiten;
Mschr. Ohr.hk. (Wien) 108 12, 526-531 (1974).

14. FERNANDEZ, C.: Dimension of the cochlea (guinea pig);
J. acoust. Soc. Amer. 24, 519 (1952).

15. GALIC, M.: Persönliche Mitteilung (1978).

16. GIEBEL, W.: Quantitative Bestimmung von Aminosäuren in Endolymphe, Perilymphe Liquor und Serum; Vortrag 10. intern. Symposion für Innenohrbiologie, Graz (1973).

17. GIEBEL, W. und H. WESPI: Serumproteine und Aminosäuren in menschlicher Perilymphe; Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 205, 182-186 (1973).

18. GIEBEL, W.: Proteins and Amino Acids in Inner Ear Fluid. In: Otorhinolaryngology Proceedings of the X. World Congress (Arslan, M. and V. Ricci, eds.); Excerpta medica ICS 337, 790-793 (1974).

19. GIEBEL, W.: Experimentelle Untersuchung zum Strömungsverhältnis der Innenohrflüssigkeiten. HNO-Jahrestagung 1974, Bad Reichen-

hall;
Arch. klin. exp. Ohr-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 207, 518 (1974).

20. GIEBEL, W., H. KAUPP und J. KOMMOSS: Die Ausbreitung löslicher Substanzen nach Applikation in in Perilymphe und Liquor; Arch. Oto-Rhino-Laryng. 213, 447-448 (1976).

21. GISSELSON, L.: The Passage of Fluorescein Sodium to the Labyrninthine Fluids; Acta otolaryng. (Stockh.) 37, 268-275 (1949).

22. GRAF, K. und G. PORETTI: Die Entstehung der Perilymphe; Pract. Oto-Rhino-Laryng. (Basel) 12, 351-365 (1950).

23. HAUG, H.-P, W. GIEBEL und H. BREUNINGER: Die Ausbreitung von Tetracyclin im Innenohr nach unterschiedlicher Applikation im Mittelohr; Arch. Oto-Rhino-Laryng. 218, 229-238 (1978).

24. HEERMANN, J., H. DAMMAD und H. SPERNAU: Perilymphschwall aus Perforation des runden Fensters nach leichtem Schädeltrauma bei vermutlich weitem Aquaeductus cochleae;
Laryng. Rhinol. 55, 549-550 (1976).

25. HUGHES, D.E. and J.T.Y. CHOU: The Origin of the Perilymph of the Inner Ear;
Life Sciences 2, 107-111 (1963).

26. JAKO, G.F.L., F.L. WEILLE, P.E. PALMER and J.W. IRWIN: An Experimental Study of the Dynamic Circulation of the Labyrinthine Fluids;
Ann. Otol. Rhinol. Laryng. (St. Louis) 68, 733-739 (1959).

27. KARBOWSKI, B.: Vergleichende anatomische Studien über den Aquaeductus cochleae und über seine Beziehung zum Subarachnoidalraum des Gehirns;
Mschr. Ohrenheilk. 64, 687-715 (1930).

28. KARLEFORS, J.: Die Hirnhauträume des Kleinhirns, die Verbindungen des IV. Ventrikels mit den Subarachnoidalräumen und der Aquaeductus cochleae beim Menschen;
Acta otolaryng. (Stockh.) Suppl. 4 (1924).

29. KELLERHALS, B.: Quantitative Assessment of Perilymph Sources;
ORL 38, 193-197 (1976).

30. KIMURA, R.S., H.F. SCHUKNECHT and C.Y.OTA: Blockage of the Cochlear Aquaeduct;
Acta otolaryng. (Stockh.) 77, 1-12 (1974).

31. KLEY, E.: Zur Herkunft der Perilymphe;
Z. Laryng. Rhinol. 30, 468-502 (1951).

32. KOBRAK, F.: Labyrinthliquor. Theoretische und angewandte Physiologie des Labyrinthliquors;
Arch. Ohr.-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 156, 30-112 (1949).

33. KOMMOSS, J.: Zur Ausbreitung löslicher Substanzen nach suboccipitaler Applikation; Inaugural-Dissertation, Tübingen (1977).

34. KOMMOSS, J. und W. GIEBEL: Die Ausbreitung löslicher Substanzen nach Applikation in die Cisterna cerebellomedullaris; Arch. Otorhinolaryng. 221, 67-76 (1978).

35. LEMPERT, J., P.E. MELZER, H. LAWRENCE, E.G. WEVER and J.T.H. RAMBO: Structure and Function of the Cochlear Aquaeduct; Arch. otol. 55, 134 (1952).

36. MAASS, B. und H.F. STUPP: Tetracyclinfluorescenz im Innenohr bei lokaler und parenteraler Applikation; Arch. Oto-Rhino-Laryng. 208, 89-96 (1974).

37. MEURMAN, Y.: Zur Anatomie und Physiologie des Aquaeductus cochleae; Vorläufige Mitteilung;

Z. Laryng. Rhinol. 17, 401-409 (1929).

38. MEURMAN, Y.: Zur Anatomie des Aquaeductus cochleae nebst einigen Bemerkungen über dessen Physiologie; Acta soc. med. Fenn. Duodecim. Ser. B 13, 1

39. Meyer, M.: Ober die Durchlässigkeit des Endolymphschlauches für Flüssigkeiten; Z. Laryng. Rhinol. Otol. und ihre Grenzgeb. 30, 455-466 (1951).

40. MÜSEBECK, K.: Die perivasculären Lymphspalten des Innenohrs; Arch. Ohr.-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 184, 560-570 (1965).

41. NEIGER, M.: Zur Morphologie und Physiologie des Aquaeductus cochleae; Fortschr. Hals-Nas.-Ohrenheilk., Vol. 15, 113-226 (1968).

42. NOMURA, Y.: Capillary permeability of the coch-

lea;
Ann. otol. 70, (1961).

43. OPPIKOFER, E.K.: Über die topographischen Beziehungen der Hirnhäute zum Felsenbein;
Z. Hals-Nas.-Ohrenheilk. 51, 1-18 (1944).

44. ORSULAKOVA,A.: Experimentelle Untersuchungen über die passiven Austauschvorgänge zwischen Liquor cerebrospinalis, Blut und Innenohrflüssigkeiten (beim Meerschweinchen);
Inaugural-Dissertation, Düsseldorf (1975).

45. PALVA, T. and K. DAMMERT: Human Cochlear Aquaeduct;
Acta otolaryng. (Stockh.) Suppl. 246 (1971).

46. QUIX, F.H. und A.A.J. v. EGMOND: Über das Eindringen von Eisen-Cocainsalzlösung aus dem Mittelohr in das Labyrinth von Meerschweinchen;

Z. Hals-Nas.-Ohrenheilk. 32, 26-53 (1933).

47. RAUCH, S.: Biochemie des Hörorgans; Einführung in die Methoden und Ergebnisse; Thieme, Stuttgart (1964).

48. RETZIUS, G.: Das Gehörorgan der Wirbeltiere; Samson und Wallin, Stockholm (1884).

49. RITTER, F.N. and M. LAWRENCE: A Histological and Experimental Study of Cochlear Aquaeduct Patiency in the Adult Human; Laryngoscope 75, 1224 (1965).

50. SANDO, J. R.P.WOOD, Y. MASUDA and W.G. HEMENWAY: Perilymphatic Communication Routes in Guinea Pig Cochlea; Ann. otol. 80, 826-834 (1971).

51. SCHINDLER, K.: Perilymphe als Ultrafiltrat des Serums; Arch. Ohr,-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 185, 586-592 (1965).

52. SCHNIEDER, E.A.: A Contribution to the Physiology of the Perilymph. Part I: The origins of Perilymph; Ann. otol. 83, 76-83 (1974).

53. SCHREINER, L.: Untersuchungen mit markierten Stoffen zur Durchgängigkeit des Aquaeductus cochleae; Arch. Ohr.-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 182, 587 (1963).

54. SCHREINER, L.: Experimentelle Untersuchungen über die Bildungsstätte und den Stoffaustausch der Perilymphe; Acta otolaryng. (Stockh.) Suppl. 212, (1966).

55. SCHUKNECHT, H.F. and A. SEIFI: Experimental Observations on the Fluid Physiology of the Inner Ear; Ann. otol. 72, 688-712 (1963).

56. SILVERSTEIN, H.: Cochlear Aquaeduct Obstruction Changes in Perilymph Biochemistry; Ann. otol. 78, 532-541 (1969).

57. SVANE-KNUDSEN, W.v.: Resorption of the cerebrospinal Fluid in Guinea pig; Acta otolaryng. 49, 240-251 (1958).

58. WALTNER, J.G.: Barrier Membrane of the Cochlear Aquaeduct. Histological Studies on the Patiency of the Cochlear Aquaeduct; Ann. otol. 47, 656 (1948).

59. WALTNER, J.G.: The Chemical Composition of the Perilymph in Cats; Laryngoscope 64 (1954).

6o. WERNER, Cl.F.: Das Gehörorgan der Wirbeltiere und des Menschen; Thieme, Leipzig (1960).

61. WITTMAACK, K.: Betrachtungen über die Erkrankungsprozesse des inneren Ohres auf der Grundlage der Tonuslehre; Arch. Ohr.-Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 141, 25-42 (1942).

62. YOUNG, W.M.: The drainage of the perilymph in macacus rhesus; Anat. Rec. 103, 524 (1949).

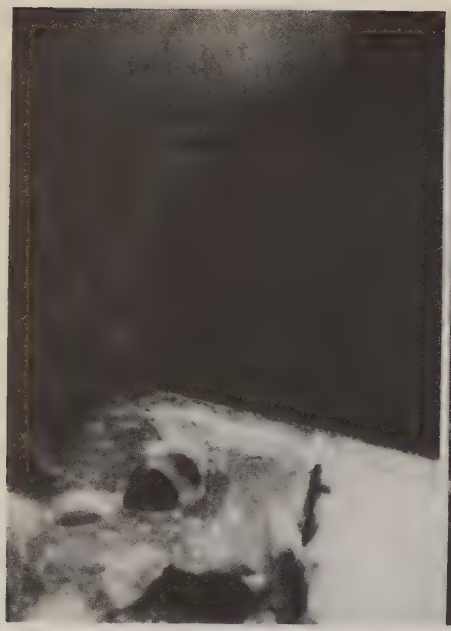
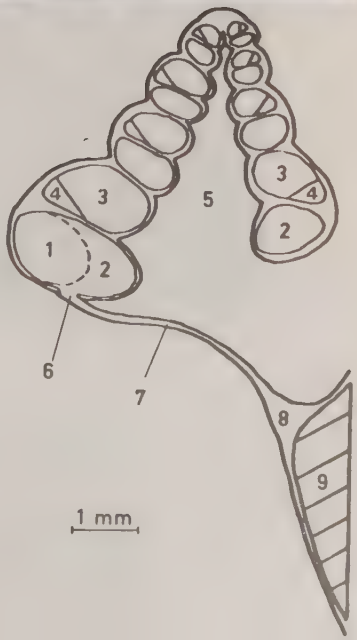


Abb. 1 (links) Demonstration der Grössenverhältnisse im untersuchten Bereich. - Die Zahlen des aufgelegten und durch das Mikroskop mitfotografierten Maßstabs sind Millimeterangaben.

Abb. 2 (oben rechts) Glücksfall einer Schnittführung, bei der der Aquädukt nahezu in seiner gesamten Länge getroffen ist.

Abb. 3 (unten) Maßstabsgetreues Schema von HAUG (1978), nach Serienschnitten angefertigt.

1 = Rundes Fenster; 2 = Scala tympani der Basalwindung; 3 = Scala vestibuli der Basalwindung; 4 = Scala media der Basalwindung; 5 = Modiolus; 6 = tympanale Mündung des Aquädukts; 7 = Ductus perilymphaticus; 8 = trichterförmiges, endocranielles Ende des Aquädukts; 9 = Hirn.



BILDTAFEL II

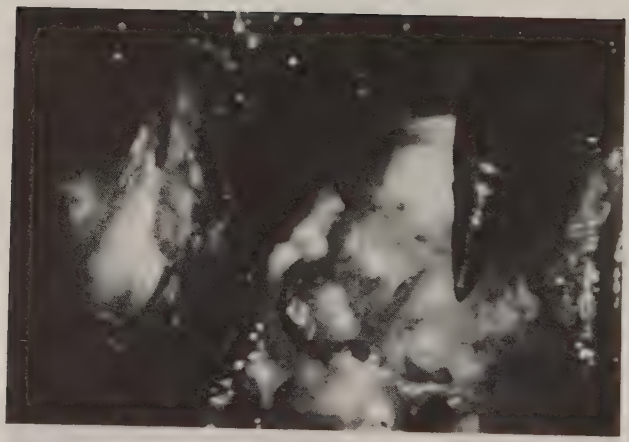


Abb. 1 Bohrer knapp über der Eingangsstelle in die Scala tympani der Basalwindung nahe des Runden Fensters.

Abb. 2 Bis an das Endost der Scala tympani reichende Bohrmulde; Rundes Fenster in Bildmitte unten eben angeschnitten am Bildrand.

BILDTAFEL III

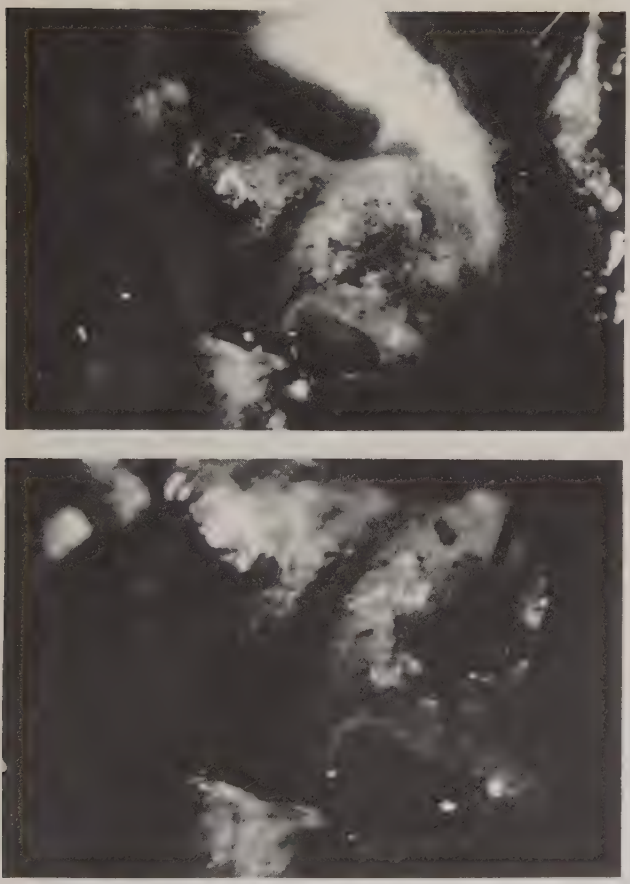


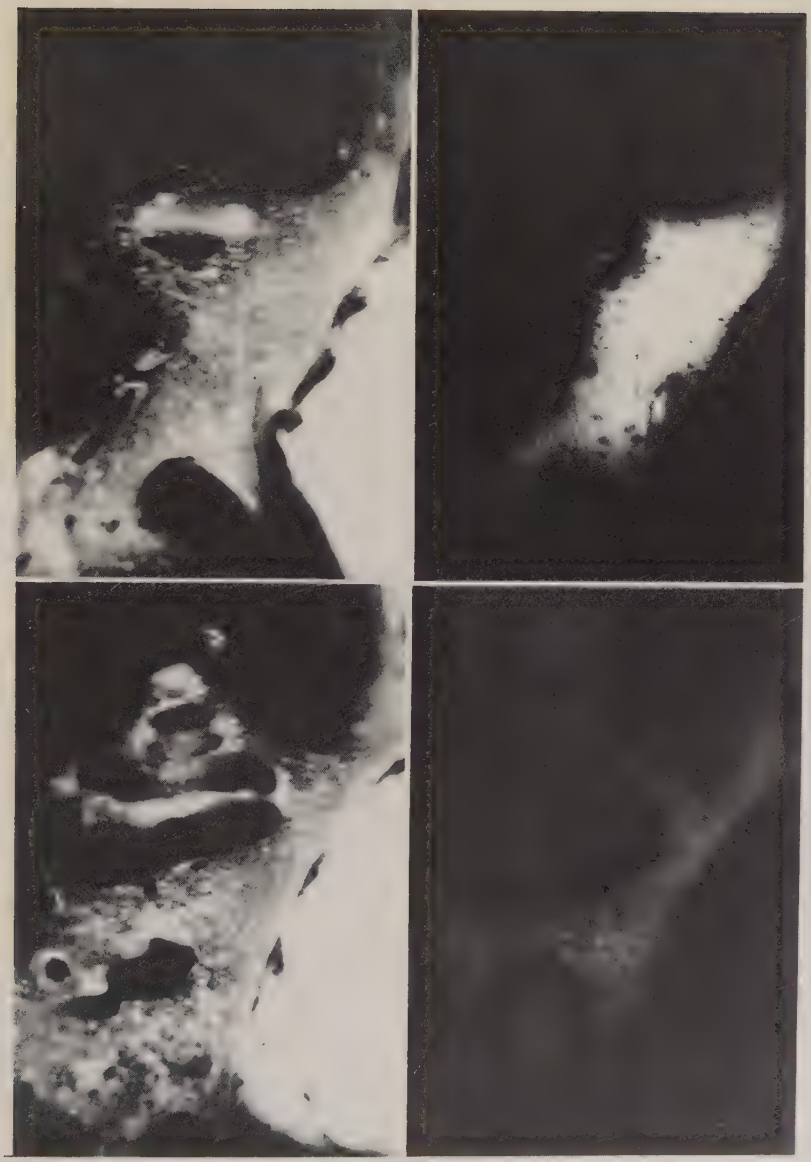
Abb. 1 Bohrmulde über der Scala tympani mit Tesafilmplättchen abgedeckt, dieses mit Histoacryl aufgeklebt.

Abb. 2 Rhodamingefüllte Glaskapillare in die Perilymphe der Scala tympani (Basalwindung) eingeführt.

BILDTAFEL IV

Rhodamin-Verteilung 10 Sekunden
nach Applikation in die 1. Windung
der Scala tympani.

Links Kunstlicht - rechts UV-Licht.



Rhodamin-Verteilung 1 Minute nach Applikation in die 1. Windung der Scala tympani.

Links Kunstlicht - rechts UV-Licht.

BILDTAFEL VI

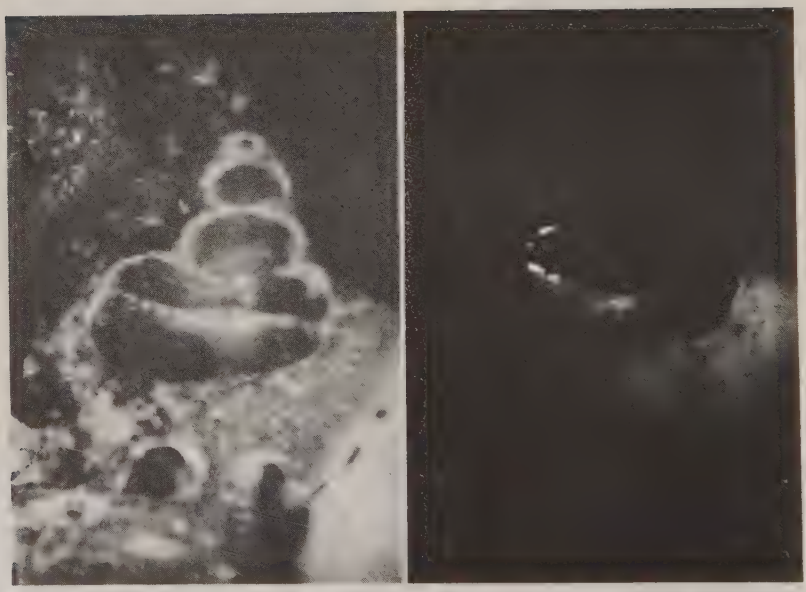
Rhodamin-Verteilung 3 Minuten nach Applikation in die 1. Windung der Scala tympani.

Links Kunstlicht - rechts UV-Licht.

Rhodamin-Verteilung 5 Minuten nach Applikation in die 1. Windung der Scala tympani.

Links Kunstlicht - rechts UV-Licht.

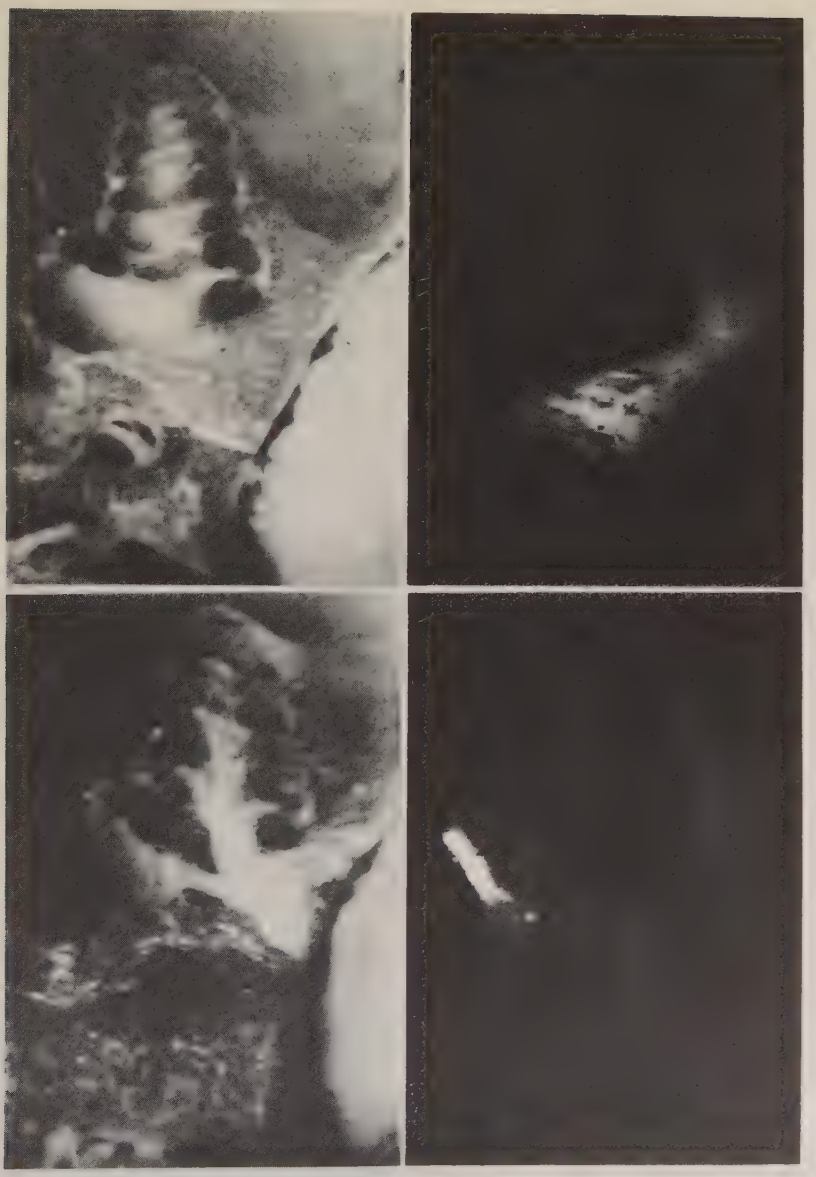
BILDTAFEL VIII



Totes Kontroll-Tier - 5 Sekunden
nach Rhodamin-Applikation in die
1. Windung der Scala tympani.

Links Kunstlicht - rechts UV-Licht.

BILDTAFEL IX

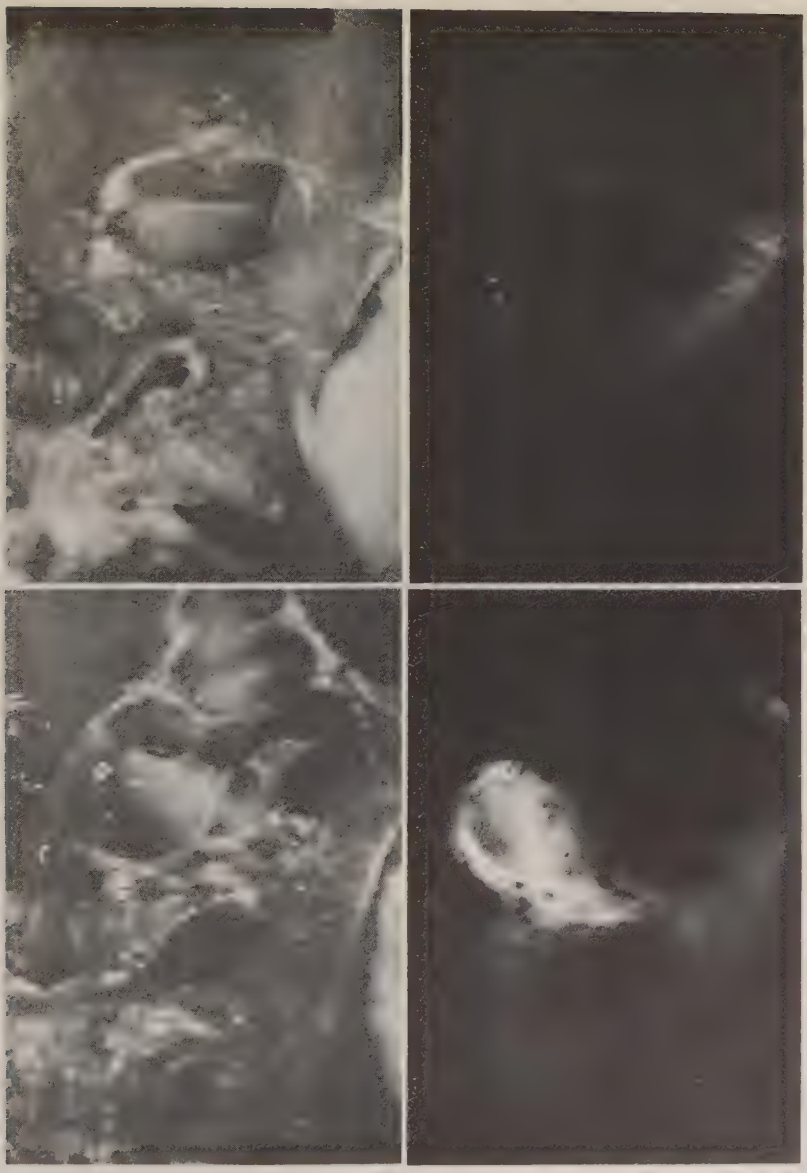


Rhodamin-Verteilung 5 Sekunden nach Applikation auf das Runde Fenster beim lebenden Meerschweinchen.

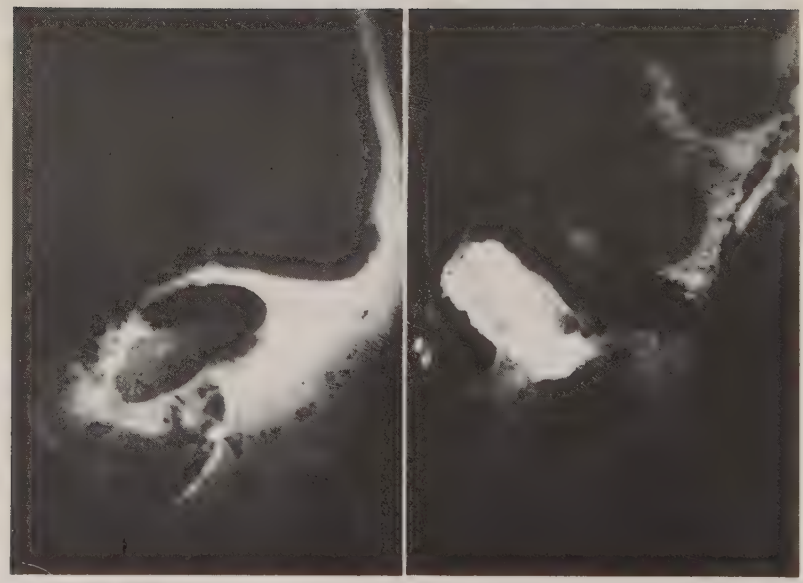
Links Kunstlicht - rechts UV-Licht.

BILDTAFEL X

Rhodamin-Verteilung 1 Minute nach Applikation auf das Runde Fenster beim lebenden Meerschweinchen.



Rhodamin-Verteilung 3 Minuten nach
Applikation auf das Runde Fenster
beim lebenden Meerschweinchen.

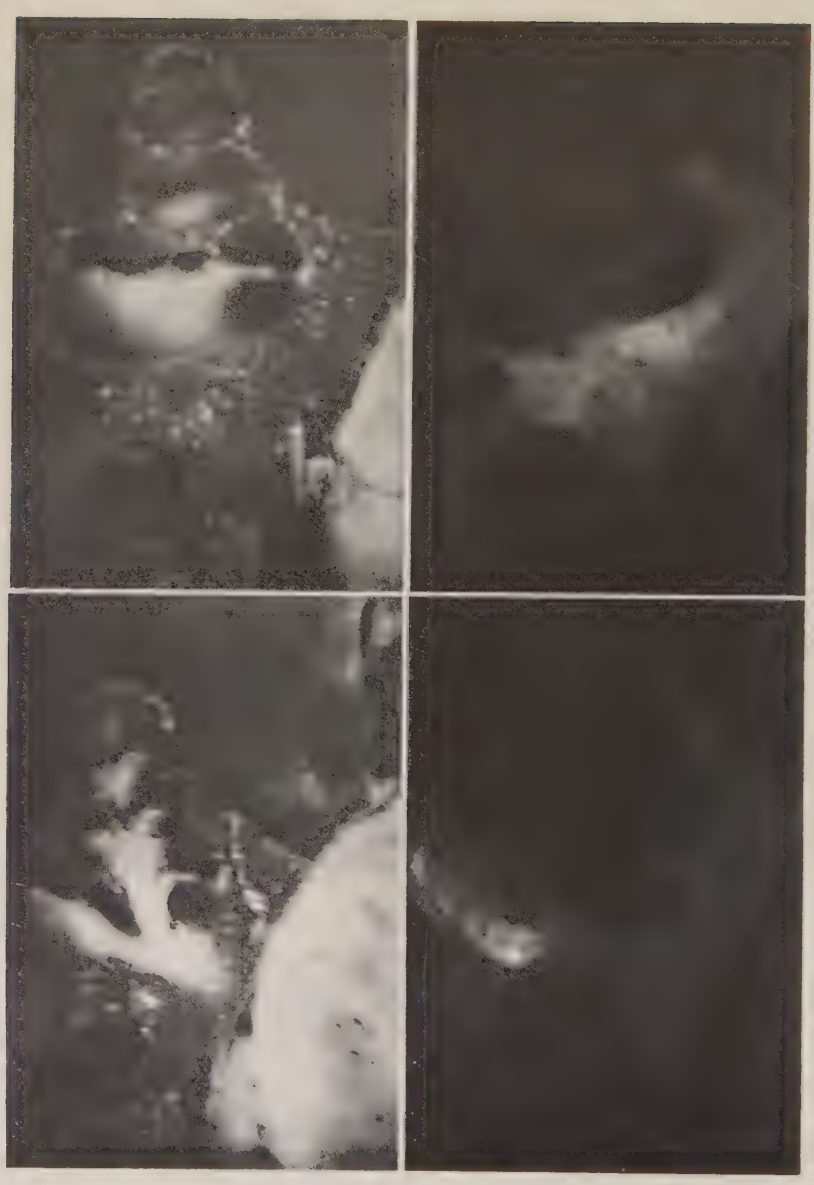


Rhodamin-Verteilung 5 Minuten nach Applikation auf das Runde Fenster beim lebenden Meerschweinchen.

- UV-Aufnahmen -

Rhodamin-Verteilung 10 Minuten nach Applikation auf das Runde Fenster beim lebenden Meerschweinchen.

BILDTAFEL XIV

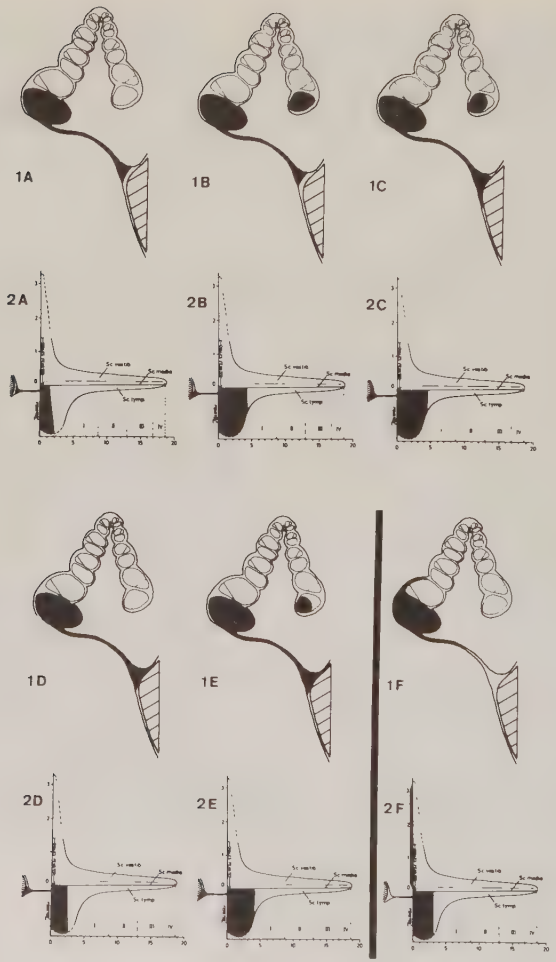


Totes Kontroll-Tier - 3 Minuten
nach Applikation von Rhodamin
auf das Runde Fenster.

BILDTAFEL XV

Rhodamin-Verteilung 16 Minuten nach diffuser, transmyringealer Farbstoffinstillation in die Bulla beim lebenden Tier.

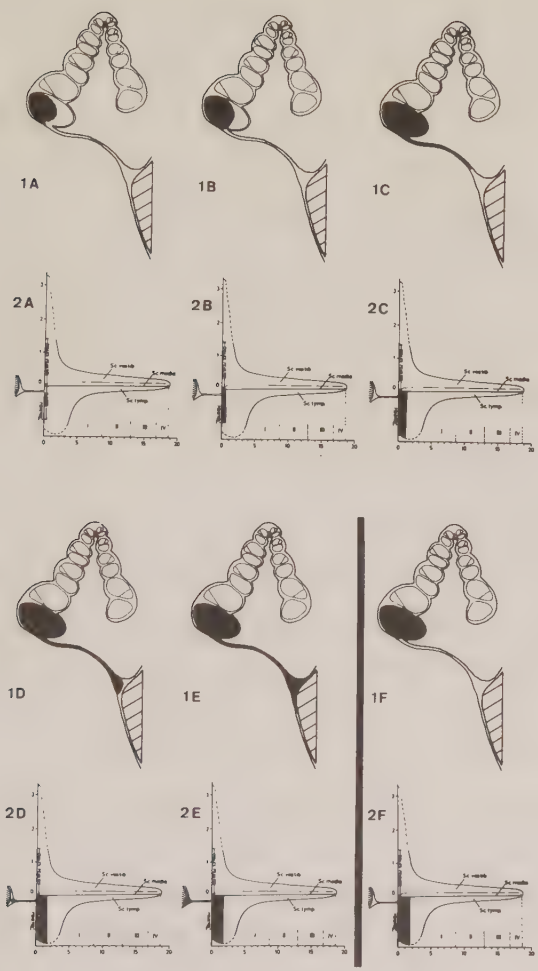
BILDTAFEL XVI



Schematische Darstellung der Rhodamin-Ausbreitung nach direkter Applikation in die Perilymphe (Scala tympani) der Basalwindung.

A = 10 Sekunden
B = 1 Minute
C = 3 Minuten
D = 5 Minuten
E = 10 Minuten
F = totes Kontrolltier - 5 Sekunden

BILDTAFEL XVII



Schematische Darstellung der Rhodamin-Ausbreitung nach Applikation auf das Runde Fenster.

A = 5 Sekunden
B = 1 Minute
C = 3 Minuten
D = 5 Minuten
E = 10 Minuten
F = totes Kontrolltier - 3 Minuten

Lebenslauf

Am 18. 12. 1948 wurde ich, Harald Kaupp, in Haiterbach Kreis Calw geboren. Nach vier Jahren an der Volksschule in Haiterbach besuchte ich bis zum Abitur 1968 das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Nagold. Anschließend studierte ich an der Universität in Tübingen zwei Semester Biologie und Physik. Im Oktober 1969 wurde ich zum Militärdienst eingezogen; der Grundwehrdienst endete im März 1971. Im Sommersemester 1971 konnte ich an der Universität in Tübingen das Studium der Humanmedizin aufnehmen. Den Studienort habe ich nicht gewechselt. Am 22. 12. 1976 endete das Medizinstudium mit bestandenem Staatsexamen. Die einjährige Medizinalassistentenzeit habe ich an der Universitäts-Hals-, Nasen- und Ohrenklinik in Tübingen, an der Medizinischen Universitätsklinik in Homburg/Saar sowie an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Hechingen abgeleistet. Im April 1978 erhielt ich die Approbation als Arzt und bin seitdem Assistenzarzt an der Universitäts-Hals-, Nasen- und Ohrenklinik in Tübingen.